Raznolikost gena DRB, DQA i DQB skupine II glavnoga sustava tkivne podudarnosti u čaglja (Canis aureus)

Celinšćak, Željka

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:865715

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Željka Celinšćak

RAZNOLIKOST GENA DRB, DQA I DQB SKUPINE II GLAVNOGA SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U ČAGLJA *(Canis aureus)*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Željka Celinšćak

DIVERSITY OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II DRB, DQA AND DQB GENES IN GOLDEN JACKAL *(Canis aureus)*

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Haidi Arbanasić i prof. dr. sc. Tihomira Florijančića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Hvala mentorici dr.sc. Haidi Arbanasić na vođenju, stručnoj pomoći i savjetima.

Hvala mentoru prof. dr. sc. Tihomiru Florijančiću na uzorcima, financijskoj potpori istraživanju i na ukazanoj brizi.

Hvala prof. dr. sc. Ani Galov, prof. dr. sc. Dubravki Hranilović i Gordani Žakman na pomoći tijekom studija.

Hvala mojoj obitelji i suprugu Josipu na podršci.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

RAZNOLIKOST GENA DRB, DQA I DQB SKUPINE II GLAVNOGA SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI U ČAGLJA *(Canis aureus)*

ŽELJKA CELINŠĆAK

Zavod za animalnu fiziologiju
Biološki odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Rooseveltov trg 6, Zagreb

Čagalj (*Canis aureus*) jedna je od najrasprostranjenijih vrsta iz porodice pasa (Canidae) u sjevernoj Africi, dijelovima Azije i jugoistočnoj Europi. U posljednjih nekoliko desetljeća dogodile su se značajne populacijske promjene čaglja u Europi koje uključuju opadanje broja, oporavak i ekspanziju čaglja. Kako bi se utvrdila mogućnost adaptacije i sposobnost dugoročnog preživljavanja populacija analizira se raznolikost gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti (MHC) koji kodiraju bjelančevine uključene u prepoznavanje patogena i pokretanje imunološkog odgovora. U ovom istraživanju istražen je ekson 2 *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusa MHC regije skupine II kod 61 jedinke čaglja iz Dalmacije, Slavonije i Srbije. Utvrđena su 4 *DRB* alela, 2 *DQA* alela i 3 *DQB* alela, te 8 različitih haplotipova. Rezultati ukazuju na različitu genetičku raznolikost populacija čaglja iz Dalmacije i Slavonije, pozitivnu selekciju na svim lokusima i djelovanje ravnotežne selekcije.

(86 stranica, 17 slika, 15 tablica, 111 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: čagalj, MHC, neuravnoteženo vezivanje, selekcija

Mentori: Dr. sc. Haidi Arbanasić

Prof. dr. sc. Tihomir Florijančić

Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Doc. dr. sc. Ivana Buj

Dr. sc. Martina Podnar Lešić

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

DIVERSITY OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II DRB, DQA AND DQB GENES IN GOLDEN JACKAL *(Canis aureus)*

ŽELJKA CELINŠĆAK

Department of Animal physiology
Department of biology
Faculty of Science
6 Roosevelt square, Zagreb

The golden jackal is one of the most widespread canid species with distribution in northern Africa, parts of Asia and Southeastern Europe. In the past few decades the European golden jackal has undergone population size contraction and expansion. Genetic variability is thought to be essential to the long-term persistence and adaptability of populations. The major histocompatibility complex (MHC) genes are crucial for eliciting immune response and are the best adaptive markers for investigating population fitness. In this thesis the genetic diversity of the second exon of the MHC II loci *DRB1*, *DQA1* and *DQB1* was analyzed in 61 individuals. Four *DRB*, two *DQA*, three *DQB* alleles and eight haplotypes were detected. Various levels of MHC diversity in Slavonian and Dalmatian populations were found. In addition, sequences showed evidence for action of balancing selection through occurrence of trans-species polymorphism and significant excess of nonsynonymous substitution.

(86 pages, 17 figures, 15 tables, 111 references, original in croatian)

Keywords: golden jackal, MHC, linkage disequilibrium, selection

Supervisors: Haidi Arbanasić, PhD

Tihomir Florijančić, PhD, Professor

Reviewers: Ana Galov, PhD, Associate professor

Ivana Buj, PhD, Assistant professor

Martina Podnar Lešić, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD ...……..…...…….1

2. LITERATURNI PREGLED ...……...…….…….5

2.1. Čagalj (*Canis aureus*) ...……...……....6

2.1.1. Sistematika i rasprostranjenost čaglja ……..……7

2.1.2. Čagalj u Hrvatskoj …….…….....10

2.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC)…….…….……...11

2.2.1. MHC i neuravnoteženo vezivanje (engl. *linkage disequilibrium*) ……..…….…...17

2.3. Istraživanja glavnoga sustava tkivne podudarnosti na divljim životinjama ……18

2.4. Istraživanja na čaglju …...……..…….....20

3. MATERIJALI I METODE……..……..22

3.1. Uzorci tkiva čaglja …….…….……...23

3.2. Izolacija DNA iz mišićnog tkiva ……...……26

3.3. Genotipizacija *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusa ……..……..…...…….26

3.3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR) …….....26

3.3.2. Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu …….....28

3.3.3. Pročišćavanje PCR proizvoda …….....…...28

3.3.4. Sekvenciranje …….……29

3.3.5. Analiza rezultata sekvenciranja ……..……...29

3.3.6. Identifikacija alela programom SeqScape ……..……29

3.4. Kloniranje odsječka DNA u plazmidnom vektoru TA kloniranjem …….……...…...30

3.4.1. Ligacija.…….……...30

3.4.2. Transformacija ……....…....31

3.4.3. Umnažanje odabranih kolonija …….....32

3.4.4. Izdvajanje plazmida iz bakterije i pročišćavanje plazmida …….....32

3.4.5. Sekvenciranje produkata kloniranja ……..……..34

3.5. Utvrđivanje haplotipova ……..…….....34

3.6. Hardy-Weinbergova ravnoteža …….……...….....34

3.7. Odabir modela supstitucije ……...…..…….....34

3.8. Evolucijske udaljenosti među alelima ……35

3.9. Filogenetska analiza ……..35

3.10. Ispitivanje djelovanja selekcije na lokusima ……..36

3.10.1. Test dN/dS ...…….36

3.10.2. OmegaMap ……...37

3.11. Izračun alelnog bogatstva (engl. *allelic richness*) ……...38

3.12. Analiza rekombinacija ……...…38

4. REZULTATI……..……..39

4.1. Karakteristike lokusa ……...40

4.1.1. *DRB1* lokus ……..40

4.1.2. *DQA1* lokus ……..43

4.1.3. *DQB1* lokus ……..……45

4.2. Haplotipovi *DRB1/DQA1/DQB1* ……48

4.3. Testiranje odstupanja heterozigotnosti u odnosu na Hardy-Weinbergovu ravnotežu …...50

4.4. Evolucijske udaljenosti među alelima ……..51

4.5. Selekcija na lokusima ……52

4.5.1. Test dN/dS ……52

4.5.2. Analiza programa OmegaMap ……52

4.6. Usporedba alelnog bogatstva programom FSTAT ……..53

4.7. Filogenetska analiza ……..53

4.7.1. Filogenetsko stablo *DRB* alela ……53

4.7.2. Filogenetsko stablo *DQA* alela ……...56

4.7.3. Filogenetsko stablo *DQB* alela ……...58

4.8. Rekombinacije ……60

5. RASPRAVA ……..……61

6. ZAKLJUČCI ……...69

7. CITIRANA LITERATURA ……..…..72

8. ŽIVOTOPIS ……..……..84

1. UVOD

Čagalj (*Canis aureus*) jedna je od najrasprostranjenijih vrsta iz porodice pasa (Canidae) s arealom koji obuhvaća središnju, istočnu i južnu Europu, sjevernu Afriku i dijelove Azije. U Europi je tijekom posljednjih nekoliko desetljeća došlo do značajnih promjena u populaciji čaglja, uključujući promjene u području rasprostranjenosti i gustoći populacija. Populacije čaglja u Europi obilježava opadanje (do 1960.), oporavak (od 1960. do 1970.) i ekspanzija (od 1980.), osobito balkanske populacije koja se širi prema središnjoj Europi, te se čagalj pojavljuje u dosad nezabilježenim područjima. Današnje promjene u rasprostranjenosti i veličini populacija vjerojatno su rezultat zaštite područja i smanjenog progona (Arnold i sur., 2012.). Čagalj je jedna od najmanje istraživanih vrsta mesoždera u svijetu unatoč širokoj rasprostranjenosti, dok se genetička struktura europskog čaglja tek od nedavno istražuje (Zachos i sur., 2009.; Fabbri i sur., 2014.).

Na površini stanica svih viših kralježnjaka izraženi su glikoproteinski receptori koji pripadaju glavnom sustavu tkivne podudarnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*). Kodirani su sustavom MHC gena koji su među najpolimorfnijim genima kralježnjaka (Alberts i sur., 2002.). Geni glavnoga sustava tkivne podudarnosti analiziraju se na molekularnoj razini posljednja tri desetljeća. Istraživanja MHC gena započela su na čovjeku zbog njihove važnosti u transplantacijskoj medicini. Danas se, međutim, istraživanja provode na sve većem broju kralježnjaka (Garrigan i Hedrick 2003.). Uloga MHC glikoproteinskih receptora je prikazivanje antigena nastalih razlaganjem bjelančevina unutarstaničnih i izvanstaničnih patogena T limfocitima, čime započinje odgovarajući imunološki odgovor. Sposobnost MHC receptora da prepoznaju različite patogene posljedica je varijabilnosti među MHC alelima (Potts i Wakeland, 1990.). Kod gena MHC skupine II, ekson 2 kodira funkcionalno značajnu regiju receptora koja veže strane peptide i glavni je nositelj polimorfizma kod MHC alela. Stoga je ekson 2 jedan od najistraženijih lokusa (Sommer, 2005.), te se analizira kao pokazatelj funkcionalnog polimorfizma MHC lokusa skupine II (Murray i sur., 1999.).

Raznolikost gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti doprinosi otpornosti prema patogenima, pozitivno djeluje na sposobnost opstanka te omogućuje dugoročno preživljavanje ugroženih vrsta. Analizom gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti možemo dobiti uvid u adaptivne procese u populaciji i sposobnost populacije da se odupre raznim patogenima, pa se koriste za istraživanja na području evolucijske ekologije i konzervacijske biologije. Promjene u frekvenciji alela kroz generacije mogu ukazati na demografske promjene neke vrste (Sommer, 2005.).

Svrha

Istraživanje će doprinijeti poznavanju polimorfizma *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusa glavnoga sustava tkivne podudarnosti (MHC) skupine II kod čaglja. Kako su istraživani lokusi pokazatelj adaptivnog potencijala populacije, rezultati ovog istraživanja dati će uvid u sposobnost preživljavanja balkanske populacije čaglja. Također ću usporediti genetičku konstituciju na MHC lokusima čaglja iz Srbije i različitih područja u Hrvatskoj. Nadalje, istražit ću evolucijske mehanizme koji uvjetuju gensku raznolikost.

Cilj i hipoteze istraživanja:

1. Utvrđivanje alela na *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusima MHC skupine II u populaciji čaglja i njihove učestalosti.
2. Utvrđivanje trolokusnih haplotipova koje tvore prisutni aleli.
3. Usporedba s neutralnim biljezima.
4. Usporedba genetičke konstitucije na MHC lokusima među populacijama s različitih područja.
5. Usporedba alela i haplotipova kod čaglja s onima koji su pronađeni kod drugih do sad istraženih srodnih vrsta (npr. vuk).
6. Analiza pokazatelja molekularne evolucije i pozitivne selekcije na istraživanim lokusima.

Opseg rada

U istraživanju sam koristila uzorke tkiva 61 jedinke čaglja koji su sakupljeni s leševa životinja nađenih ili ustrijeljenih na području Hrvatske i Srbije tijekom sezone lova. Na sakupljenim uzorcima sam istraživala polimorfizam eksona 2 *DQA1*, *DQB1* i *DRB1* genskih lokusa MHC skupine II. Analizirala sam broj i vrstu alela svakog lokusa, te stupanj raznolikosti među alelima

i njima pripadajućim aminokiselinskim sljedovima. Utvrdila sam *DRB1/DQA1/DQB1* trolokusne haplotipove i usporedila alele i haplotipove sa dostupnim podacima ostalih vrsta iz roda *Canis*. Također sam upotrebom različitih računalnih programa analizirala pokazatelje molekularne evolucije na lokusima.

Metode

Za utvrđivanje genetičkog statusa populacije čaglja u Hrvatskoj i Srbiji istraživala sam ekson 2 gena *DQA1*, *DQB1* i *DRB1* koji pripadaju skupini II glavnoga sustava tkivne podudarnosti. Istraženi geni smatraju se značajnim adaptivnim biljezima koji su informativni u pogledu mogućnosti prilagodbe i opstanka neke vrste ili populacije (Bernatchez i Landry, 2003.; Piertney i Oliver, 2006.; Sommer, 2005.). Prihvaćeno je mišljenje da je razina polimorfizma koja je prisutna na lokusima u korelaciji sa sposobnošću imunološkog sustava da odgovori na različite patogene (Kindt i sur. 2007.). Ekson 2 kodira domenu receptora koja sudjeluje u vezanju antigenskog peptida i glavni je nositelj polimorfizma među alelima. Zbog toga se ekson 2 uobičajeno analizira kao pokazatelj funkcionalnog polimorfizma MHC lokusa skupine II (Murray i sur., 1999.). Koristila sam slijedeće laboratorijske molekularne tehnike: izolacija DNA, lančana reakcija polimerazom, elektroforeza, sekvenciranje i kloniranje odsječka DNA pomoću plazmidnog vektora. Za analize sam koristila slijedeće računalne programe: SeqScape 2.5 (Applied Biosystems), MEGA 7.1 (Kumar i sur., 2016.), Arlequin 3.11. (Excoffier i sur. 2005.), BioEdit (Hall, 1999.), OmegaMap (Wilson i McVean, 2006.), FSTAT (Goudet, 2002.), RDP4 (Martin i sur., 2015.).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Čagalj (*Canis aureus*)

Čagalj (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) (Slika 1.) zvijer je iz porodice pasa (Canidae), duljine trupa 90 – 100 cm, duljine repa oko 25 cm, visine oko 50 cm, te mase 7 – 15 kg (Bošković, 2013.). Izgledom podsjeća na vuka, lisicu i psa. Zabilježene su regionalne i sezonske razlike u boji krzna čaglja. Krzno čaglja na području Hrvatske najčešće je smeđe-zlatno-žute boje koja na donjim dijelovima trupa prelazi u prljavo bijelu ili sivkastožutu boju, dok na leđima i bokovima prelazi u smeđu ili crnu boju (Bošković i sur., 2015.). Čagalj živi u čoporu kojeg čine roditeljski par, odnosno spolno zreli mužjak i ženka u dobi preko dvije godine i njihova mladunčad do godine dana starosti. Monogaman je, te smrću jednog od partnera čagalj počinje skitalački način života u potrazi za novim partnerom pri čemu osvaja nove prostore. Prema načinu prehrane čagalj je tipični svežder koji se hrani lako dostupnom hranom poput malih sisavaca, najčešće glodavcima, ostacima plijena drugih predatora, otpacima ali i biljnom hranom kao što su voće i žitarice (Bošković, 2013.).



Slika 1. Čagalj (*Canis aureus)*
(preuzeto iz: http://www.lovac.info/lov-divljac-hrvatska/divljac-lov-zivotinja-divljaci/4640-cagalj-se-siri-po-europi.html)

2.1.1. Sistematika i rasprostranjenost čaglja

Čagalj *(Canis aureus*) je sisavac (Mammalia) iz reda zvijeri (Carnivora) i porodice pasa (Canidae) koja uključuje 16 rodova i 36 vrsta (Nowak, 1999.). Rod *Canis* uključuje šest vrsta: prugasti čagalj (*Canis adustus*), čagalj (*Canis aureus*), kojot (*Canis latrans*), sivi vuk (*Canis lupus*), sedlasti čagalj (*Canis mesomelas*), crveni vuk (*Canis rufus*) i etiopijski vuk (*Canis simensis*). Sistematiku porodice pasa (Canidae) prikazala sam u Tablici 1.

Tablica 1. Sistematika porodice pasa

Carstvo:	Animalia – životinje
Koljeno:	Chordata – svitkovci
Razred:	Mammalia Linnaeus, 1758 – sisavci
Red:	Carnivora – zvijeri
Porodica:	Canidae – psi
Rod:	*Canis* Linnaeus, 1758
Vrste:	*C. adustus* Sundevall, 1847 – prugasti čagalj
	C. aureus Linnaeus, 1758 – čagalj
	C. latrans Say, 1823 – kojot
	C. lupus Linnaeus, 1758 – sivi vuk
	C. mesomelas Schreber, 1775 – sedlasti čagalj
	C. rufus Audubon & Bachman, 1851 – crveni vuk
	C. simensis Rüppell, 1840 – etiopijski vuk

Čagalj nastanjuje tri kontinenta: Afriku, Aziju i Europu. Slika 2. prikazuje područje rasprostranjenosti čaglja u svijetu koje obuhvaća sjevernu i sjeveroistočnu Afriku od Senegala do Egipta, Arapski poluotok, Tursku, Siriju, Irak, Iran, središnju Aziju, Indijski potkontinent, Sri Lanku, Myanmar, Tajland i dijelove Indokine, te dio Europe (Jhala i Moehlman, 2008.).

S obzirom na oportunistički način života i potencijal da se prilagodi različitim vrstama kopnenih staništa i ekosustava, uključujući i okoliš izmijenjen čovjekovim utjecajem (Lanszki i sur., 2010.), čaglja nalazimo u pustinjskim, šumskim, močvarnim, nizinskim i brdskim područjima, ali i poljoprivrednim, ruralnim i poluurbanim područjima gdje se hrani ljudskim otpacima (Giannatos, 2004.; Jhala i Moehlman, 2008.).



Slika 2. Rasprostranjenost čaglja u svijetu (preuzeto iz: Jhala i Moehlman, 2008.)

Smatra se da je čagalj nastanio Europu tijekom ranog holocena (Sommer i Benecke, 2005.), gdje mu je područje rasprostranjenosti bilo ograničeno na jugoistočni dio Europe. U drugoj polovici 19. stoljeća širi se Podunavljem do Mađarske (Trouwborst i sur., 2015.), a od sredine 20. stoljeća širi se istočnim dijelom Jadranske obale (Kryštufek i Tvrtković, 1990.) i nizinskim dijelom jugoistočne i središnje Europe, te se pojavljuje u dosad nezabilježenim područjima. Širenje populacije čaglja uslijedilo je nakon značajnog pada populacije koji se dogodio 1960.-

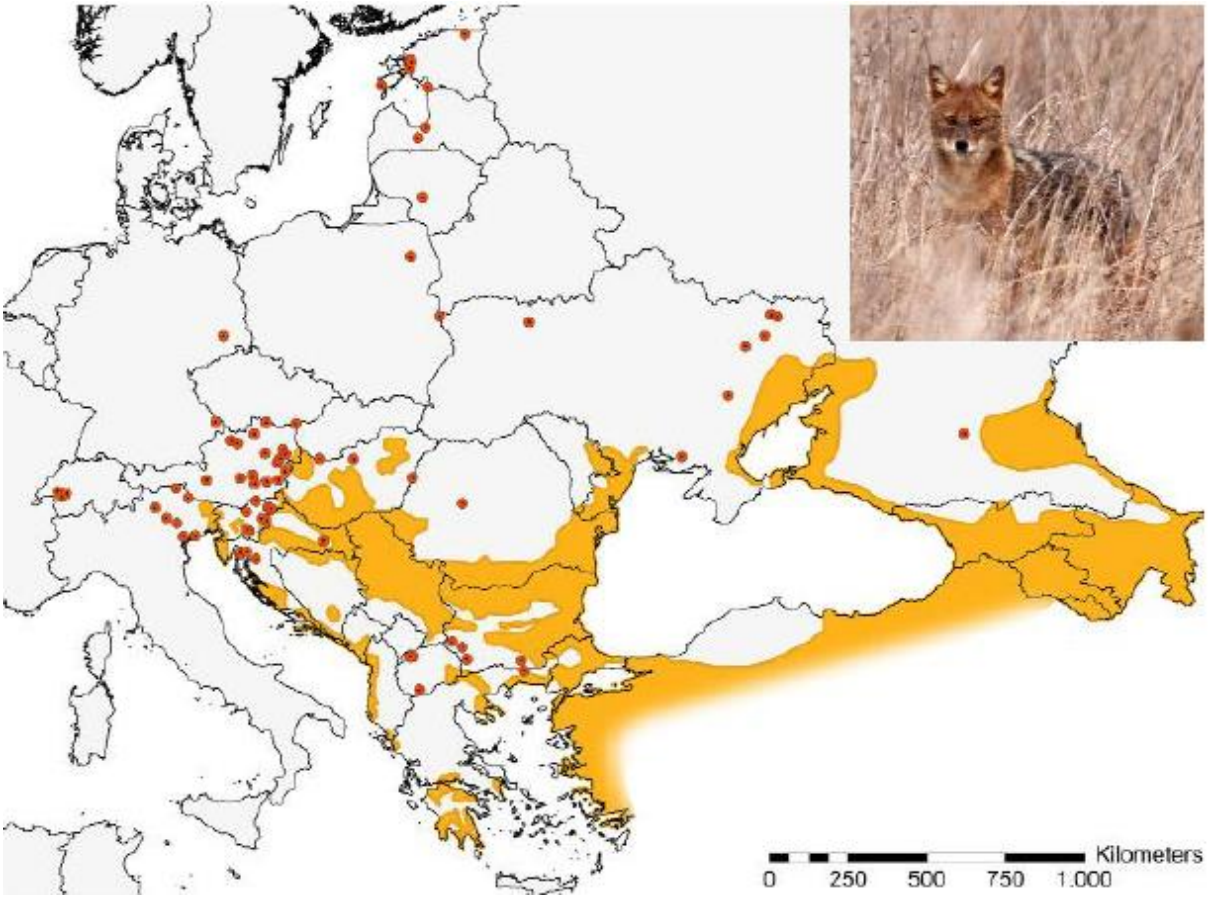
ih godina zbog smanjenja staništa i prekomjernog lova (Spassov, 1989.). Značajni val ekspanzije čaglja u Europi dogodio se nakon 1950.-ih i 1980.-ih godina (Trouwborst i sur., 2015.).

Trenutačno područje rasprostranjenosti čaglja u Europi obuhvaća Albaniju, Armeniju, Austriju, Azerbajdžan, Bosnu i Hercegovinu, Bugarsku, Hrvatsku, Gruziju, Grčku, Mađarsku, Italiju, Kosovo, Makedoniju, Moldaviju, Crnu Goru, Rumunjsku, Rusiju, Srbiju, Sloveniju, Tursku i Ukrajinu. U navedenim državama čagalj je trajno nastanjen, dok su lutalice zabilježene u Bjelorusiji, Češkoj, Estoniji, Njemačkoj, Latviji, Litvi, Poljskoj, Slovačkoj i Švicarskoj (Trouwborst i sur., 2015.). Slika 3. prikazuje trenutačnu rasprostranjenost čaglja u Europi.

Razlozi trenutačnog širenja populacije čaglja nisu još do kraja razjašnjeni, a pretpostavlja se da ulogu u rasprostranjivanju čaglja imaju promjena klime, zakonska zaštita čaglja i promjene u upravljanju poljoprivrednim zemljištima. Također, na područjima na kojima vuk ne obitava ili nije uobičajen, rasprostranjivanje čaglja još je uspješnije (Trouwburst i sur., 2015.).

Budući da je sadašnje širenje populacije čaglja nastupilo naglo, pojedine zemlje smatraju čaglja potencijalno invazivnom vrstom (Trouwborst i sur., 2015.). Također, čagalj je mogući domaćin za veći broj patogena kao što su *Babesia*, *Hepatozoon*, *Theileria annae*, *Leishmania*, *Brucella canis*, *Dirofilaria* (Mitková i sur., 2017.; Ćirović i sur., 2014.; Ionică i sur., 2016.; Farkas i sur., 2014.). S obzirom na srodstvo s vukovima i psima, kao i širenje područja rasprostranjenosti, čagalj predstavlja potencijalnog prenositelja bolesti za psa, ali i čovjeka.

Čagalj se trenutno nalazi na IUCN-ovom (engl. *International Union for Conservation of Nature*, Međunarodni savez za zaštitu prirode) crvenom popisu ugroženih vrsta, te mu je dodijeljen status *least concern* tj. najmanje zabrinjavajući. Zaštićen je Konvencijom o biološkoj raznolikosti iz 1992. godine, Konvencijom o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa iz 1979. godine (Bernska konvencija) i Direktivom Europske unije iz 1992. godine o očuvanju prirodnih staništa i divlje faune i flore (Direktiva o staništima). Dok je u pojedinim europskim zemljama čagalj u potpunosti zaštićen na nacionalnoj razini, u drugima je nezaštićen i lovljen (Trouwborst i sur., 2015.).



Slika 3. Rasprostranjenost čaglja u Europi (preuzeto iz: Trouwborst i sur., 2015.)

2.1.2. Čagalj u Hrvatskoj

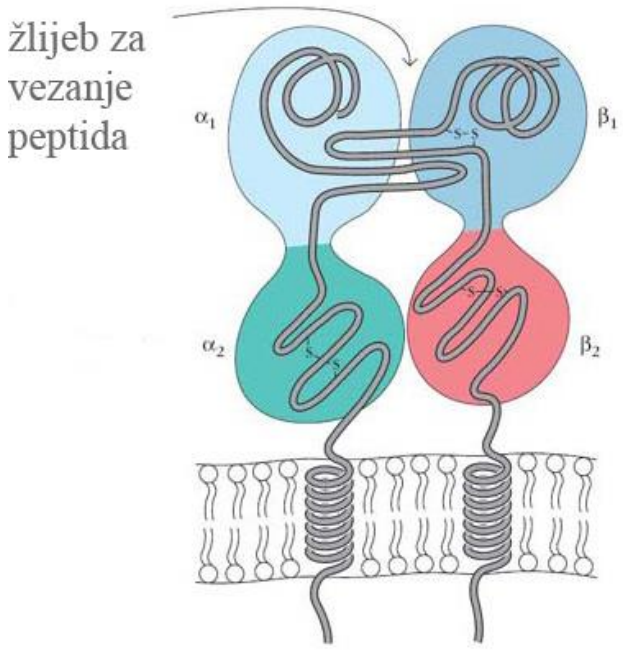
U Hrvatskoj razlikujemo dvije populacije čaglja različitoga podrijetla, na području Dalmacije i Slavonije. Čagalj je prvi puta zabilježen u Hrvatskoj u 15. stoljeću na području južne Dalmacije odakle se 1980.-ih godina počinje širiti na sjever prema Istri, Sloveniji i Italiji (Kryštufek i Tvrtković, 1990.). Prvi sporadični nalazi čaglja u Slavoniji zabilježeni su početkom 1900.-ih, odakle se širi posljednjih petnaest godina. Pojava čaglja u Slavoniji smatra se posljedicom širenja čaglja Podunavljem iz Srbije, Bugarske i Rumunjske (Giannatos, 2004.). Populacije čaglja iz Dalmacije i Slavonije, osim različitoga podrijetla su i geografski razdvojene, stoga su među njima zabilježene i genetičke razlike (Fabbri i sur., 2014.). Prema Zakonu o lovstvu („Narodne novine“ 140/05, 75/09, 14/14) čagalj je u Republici Hrvatskoj svrstan u sitnu dlakavu divljač. Prema odredbama Pravilnika o lovostaju („Narodne

novine“ 67/10, 87/10, 97/13) lov na čaglja dopušten je tijekom cijele godine, osim za ženke dok su visoko bređe ili vode sitnu mladunčad.

2.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC)

Na površini stanica kralježnjaka izraženi su glikoproteinski receptori glavnoga sustava tkivne podudarnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) čija je uloga prikazivanje stranih proteina T limfocitima. T limfociti mogu prepoznati strane peptide samo kada su izloženi na MHC receptorima stanica domaćina. Iako to nije njihova glavna svrha, prvotno su proučavani kao čimbenici o kojima ovisi odbacivanje organa (Male i sur., 2006.). Razlikujemo dvije vrste MHC receptora, skupinu I i II, koje se međusobno razlikuju građom i načinom djelovanja (Male i sur. 2006.). Receptori MHC skupine I nalaze se na svim stanicama s jezgrom i prikazuju antigene koji potječu od unutarstaničnih patogena (npr. virusa) citotoksičnim T limfocitima. Receptori MHC skupine II izraženi su samo na predočnim stanicama, tj. limfocitima B, makrofazima i dendritičnim stanicama, te prikazuju antigene dobivene razgradnjom izvanstaničnih patogena (npr. bakterije, gljivice) pomoćničkim T limfocitima (Kindt i sur., 2007.).

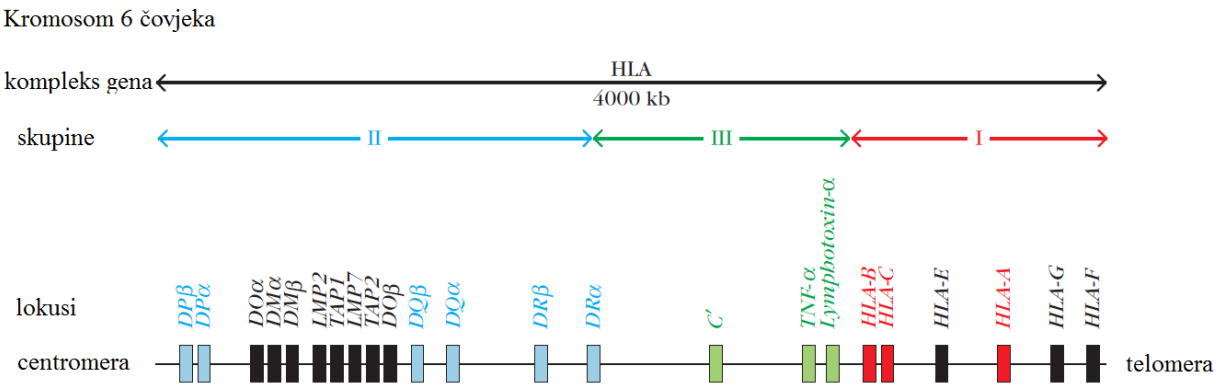
Slika 4. daje shematski prikaz receptora MHC skupine II. Receptori MHC skupine II su transmembranski glikoproteini građeni od dva različita polipeptidna lanca, vezana nekovalentnim vezama. To su α lanac, relativne molekularne mase 33 kDa i β lanac, relativne molekularne mase 28 kDa. Receptori MHC skupine II sastoje se od citoplazmatskog dijela, transmembranskog dijela i izvanstaničnog dijela koji se može funkcionalno podijeliti na domene α_1 i α_2, te β_1 i β_2. Vršne domene α_1 i β_1 zajedno tvore žlijeb koji veže strani peptid duljine 13-24 aminokiselina (Kindt i sur., 2007.).



Slika 4. Shematski prikaz receptora MHC skupine II
(preuzeto i prilagođeno iz Kindt i sur., 2007.)

Geni koji kodiraju receptore MHC skupine I i II nalaze se unutar genskog sustava MHC. Kompleks gena tkivne podudarnosti kod čovjeka naziva se HLA (engl. *human leukocyte antigens*) jer je otkriven na leukocitima, u miša H-2 (Male i sur., 2006.), dok se kod vrsta iz porodice Canidae naziva DLA (engl. *dog leukocyte antigene*). MHC genski sustav kod čovjeka je smješten na kraćem kraku kromosoma 6, kod miševa na kromosomu 17 (Kindt i sur., 2007.), dok se kod vrsta iz porodice Canidae nalazi na kromosomu 12 i manji dio na kromosomu 35 (Yuhki i sur., 2007.).

Jedna od prvih potpuno sekvenciranih većih genskih regija bio je upravo ljudski MHC. Slika 5. prikazuje organizaciju ljudske MHC regije. Veličina regije je oko 4 Mb a sadrži oko 260 gena, od kojih nemaju svi imunološku ulogu (Trowsdale i Knight, 2013.). Ljudski MHC geni organizirani su u tri genske skupine: I, II i III. Za razliku od gena MHC skupine I i II, čiji su produkti većinom receptori na površini stanica, produkti gena MHC skupine III vrlo su raznoliki. To su molekule sustava komplementa, citokini, proteini toplinskog stresa, te ostale molekule uključene u obradu antigena (Male i sur., 2006.).



Slika 5. Organizacija ljudske MHC regije. Geni MHC skupine I obojeni su crveno, geni MHC skupine II obojeni su plavo i geni MHC skupine III obojeni su zeleno (preuzeto i obrađeno iz: Kindt i sur. 2007.).

Građa MHC genske regije razlikuje se među različitim vrstama, što je rezultat gubitka ili nastanka pojedinih lokusa (Trowsdale i Knight, 2013.). Vrste se mogu razlikovati prema broju pojedinih MHC lokusa. Tablica 2. prikazuje usporedbu gena MHC skupine II kod ljudi i kod pasa. Kod ljudi nalazimo jedan *DRA* lokus, devet *DRB* lokusa, po dva *DQA*, *DQB*, *DPA* i *DPB* lokusa, te po jedan *DMA* i *DMB* lokus (Robinson i sur., 2015.). Kod vrsta iz porodice pasa (Canidae) nalazimo po jedan *DRA* lokus, dva *DRB* lokusa, jedan *DQA* lokus, dva *DQB* lokusa, jedan *DPA* lokus, dva *DPB* lokusa, jedan *DOP* lokus te jedan *LMP-2* lokus (Wagner, 2003.). Iz tablice je vidljivo da su pojedini geni multiplicirani, kao što je HLA-*DRB* kod kojega postoji čak devet različitih HLA-*DRB* lokusa.

Tablica 2. Lokusi MHC skupine II kod ljudi i kod pasa, te njihovi nazivi.

Gen	HLA lokusi	DLA lokusi
DRA	*DRA*	*DRA1*
DRB	*DRB1 – DRB9*	***DRB1***, *DRB2*
DQA	*DQA1*, *DQA*	***DQA1***
DQB	*DQB1*, *DQB*	***DQB1***, *DQB2*
DPA	*DPA1*, *DPA2*	*DPA1*
DPB	*DPB1*, *DPB2*	*DPB1*, *DPB2*
DOB	/	*DOB*
DMA	*DMA*	/
DMB	*DMB*	/
LMP-2	/	*LMP-2*

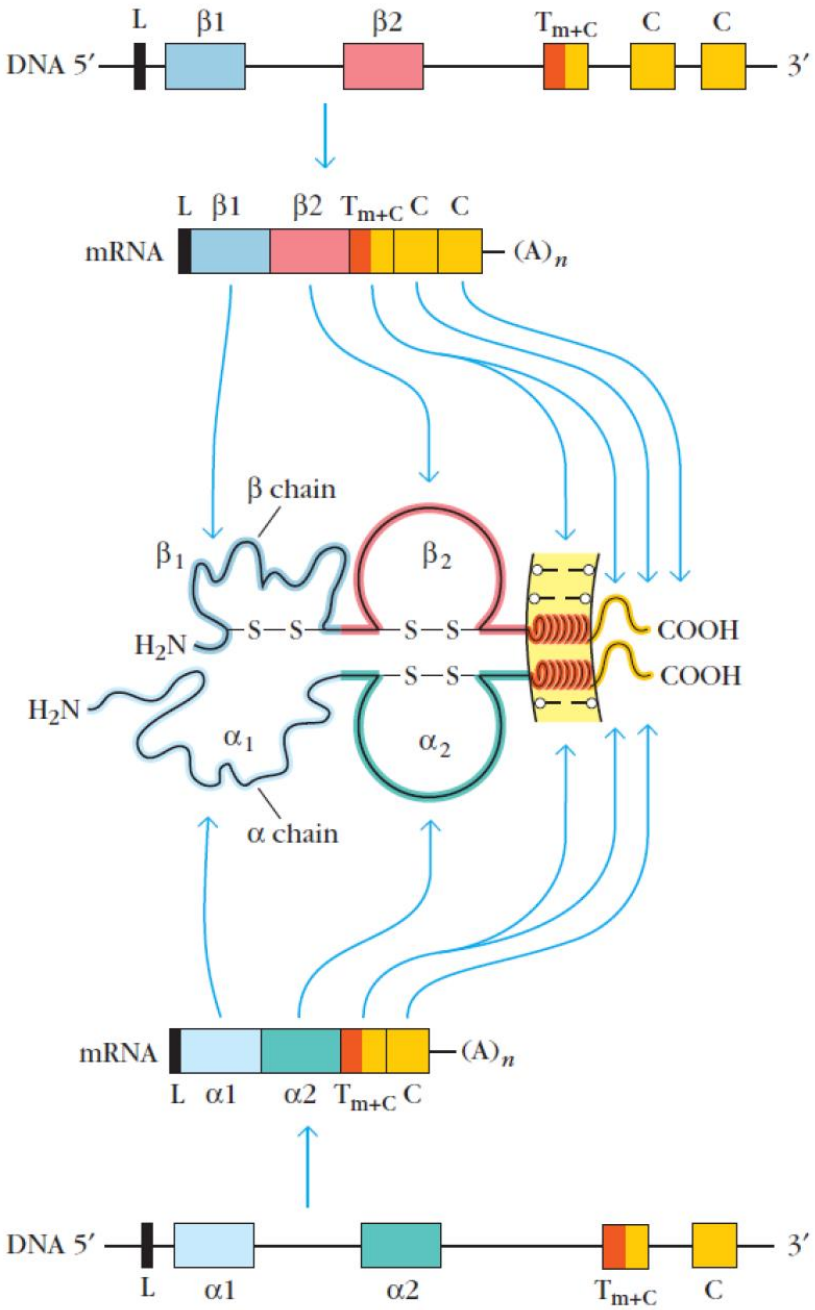
Lokusi istraženi u ovom istraživanju masno su otisnuti.

Uzrok raznolikosti u građi MHC genske regije kod različitih vrsta je brza evolucija MHC sustava. Pritom MHC skupina I brže evoluira od MHC skupine II (Takahashi, 2000.).

MHC lokuse odlikuje poligenija i polimorfnost. To znači da je pojedini MHC receptor kodiran većim brojem gena, te da za pojedini lokus postoji više alela u populaciji. Poligenija se očituje prilikom sparivanja α i β lanaca MHC receptora. S obzirom da pojedini lokusi mogu biti multiplicirani jedinka može izraziti više različitih α i β lanaca koji se mogu sparivati u raznim kombinacijama. Rezultat je povećanje broja raznovrsnih receptora na staničnoj membrani. Posjedovanjem različitih MHC receptora, jedinka može predočiti širok spektar antigena, što za posljedicu ima bolju obranu organizma od bolesti, a to dugoročno rezultira boljom sposobnosti opstanka (Kindt i sur. 2007.).

Raznolikosti MHC receptora na razini populaciji doprinosi postojanje velikog broja alela pojedinog lokusa u populaciji. To rezultira postojanjem još većeg broja različitih MHC receptora na razini populacije. Veći broj različitih receptora znači i bolja obrana od patogena. Zbog toga se genetička raznolikost MHC gena proučava kao pokazatelj sposobnosti preživljavanja populacije, osobito ugroženih i izoliranih populacija (Piertney i Oliver, 2006.; Sommer, 2005.; Landry, 2003.)

Najpolimorfniji ljudski lokus je HLA-B lokus, koji pripada MHC skupini I, a kod kojega je poznato više od 4000 različitih alela (Robinson i sur., 2015.). Polimorfizam gena MHC rezultat je rekombinacija, genske konverzije i točkastih mutacija (Andreis, i sur., 2004.). Razina polimorfizma razlikuje se kod različitih lokusa, ali i unutar pojedinog lokusa. Geni koji kodiraju β lance su polimorfniji od onih koji kodiraju za α lance i mogu sadržavati više stotina alela. Nositelj polimorfizma unutar MHC gena skupine II je ekson 2, koji kodira domenu receptora koja prepoznaje i veže antigen. Slika 6. prikazuje građu receptora MHC skupine II i gene koji ga kodiraju. Geni koji kodiraju α i β lance receptora građeni su od introna i eksona, a sadrže vodeći ekson (L), α1 ili β1 ekson, α2 ili β2 ekson, transmembranski ekson i jedan ili više citoplazmatskih eksona. Ekson 2 kodira domene receptora čijim spajanjem nastaje vezni žlijeb koji veže strani peptid (Kindt i sur., 2007.). Iz tog je razloga ekson 2 najvarijabilniji dio gena, te se istražuje kao pokazatelj funkcionalnog polimorfizma (Murray i sur., 1999.). Razlike među alelima pojedinog lokusa nalaze se upravo u području eksona 2, a očituju se kao promjene u jednom ili više nukleotida.



Slika 6. Građa receptora MHC skupine II i geni koji ga kodiraju (preuzeto i obrađeno iz: Kindt i sur., 2007.)

Osim što su MHC lokusi polimorfni, zabilježena je prisutnost velikog broja alela u populaciji kroz dugo vremensko razdoblje. Navedena pojava rezultat je djelovanja ravnotežne selekcije na MHC lokusima (Richman, 2000.). U okviru ravnotežne selekcije prednost se daje heterozigotima u populaciji, kao i postojanju rijetkih alela. Heterozigoti mogu izraziti veći broj MHC receptora, a time i predočiti veći broj antigena u usporedbi s homozigotima (Doherty i Zingernagel, 1975.; Hughes i Nei, 1992.). Kod heterozigotnih jedinki zabilježena je smanjena podložnost infekcijama, sporije napredovanje bolesti i brži oporavak (Sommer, 2005.). Jedinke koje nose rijetke alele imaju prednost u obrani od potencijalnih novih patogena (Clarke i Kirby, 1966.). Takve jedinke uspješno će se obraniti od patogena, imati potomstvo i time rasprostraniti rijetki alel koji će i njihovim potomcima omogućiti obranu od istog patogena.

Iako je glavna uloga glavnoga sustava tkivne podudarnosti obrana organizma od patogena, kod ljudi se pojedini MHC aleli i njihove mutacije vežu uz pojavu određenih bolesti kao što je narkolepsija i hemokromatoza, pojavu tumora, osjetljivost na lijekove, utječu na uspješnost transplantacije i transfuzije, odgovorni su za autoimune bolesti, probleme u trudnoći, dugovječnost i odabir partnera. Nosioci određenih alela ili haplotipova mogu biti više ili manje osjetljivi na određene zarazne bolesti (Mosaad, 2015.).

2.2.1. MHC i neuravnoteženo vezivanje (engl. *linkage disequilibrium*)

Budući da su MHC lokusi smješteni na kromosomu vrlo blizu jedan drugome nasljeđuju se zajedno, što nazivamo vezanost gena. Kombinacija određenih alela naziva se haplotip i nasljeđuje se od jednog roditelja. Od svakog roditelja nasljeđuje se po jedan haplotip a oba su izražena kodominantno na staničnoj membrani. Veća učestalost pojedinih kombinacija alela u populaciji posljedica je takvog neuravnoteženog vezivanja (engl. *linkage disequilibrium*). Zbog blizine genskih lokusa MHC rijetko dolazi do rekombinacija među njima što doprinosi očuvanju haplotipova u populaciji. Održavanje haplotipova u populaciji daje selektivnu prednost jedinkama neke populacije s obzirom da im omogućuje uspješnu borbu s uobičajenim patogenima populacije (Male i sur., 2006.; Kindt i sur., 2007.).

2.3. Istraživanja glavnoga sustava tkivne podudarnosti na divljim životinjama

Genetička raznolikost važan je čimbenik koji ukazuje na sposobnost preživljavanja populacija divljih životinja. Iako se često provode genetička istraživanja na neutralnim biljezima kao što su mtDNA, mikrosateliti i SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*), ona ne daju informaciju o selektivnim procesima koji uključuju interakciju jedinki s okolišem i sposobnost prilagodbe na promjene. Stoga se sve češće provode istraživanja glavnoga sustava tkivne podudarnosti (MHC). Genetička raznolikost MHC neposredno utječe na obranu od patogena, podložnost infekcijama, pojavu autoimunih bolesti i odabir partnera, što sve utječe na sposobnost opstanka. Gubitak genetičke raznolikosti dovodi do smanjenja sposobnosti opstanka, čemu su osobito sklone male populacije zbog utjecaja genetičkog drifta i parenja u srodstvu. Posljedica je gubitak alela, fiksacija štetnih alela i smanjenje heterozigotnosti. Zbog čovjekova utjecaja na okoliš sve je više fragmentiranih i izoliranih staništa divljih životinja, nema razmjene genetičkog materijala što vodi smanjenju genetičke raznolikosti (Sommer, 2005.). Raznolikost MHC-a pokazatelj je sposobnosti populacije da se prilagodi promjenama u okolišu, što je od posebnog značaja za ugrožene vrste i populacije divljih životinja (Bernatchez i Landry, 2003., Garrigan i Hedrick, 2003.). To potvrđuje primjer otočne lisice *(Urocyon littoralis dickeyi*) na otoku San Nicolas, koja je pokazuje dosad najnižu zabilježenu razinu genetičke raznolikosti kao posljedicu genetičkog drifta. Unatoč tome, raznolikost MHC lokusa je očuvana (Aguilar i sur. 2004.). Također, u istraživanju na uzorku od 172 jedinke europskog bizona (Radwan i sur., 2007.) pronađena su samo četiri, ali vrlo raznolika *DRB* alela.

Do danas su na vrstama iz porodice Canidae provedena istraživanja MHC na divljim vrstama kao što su vukovi u Sjevernoj Americi (Kanada i Aljaska) (Kennedy i sur., 2007.a), u sjevernoj Europi (Skandinavski poluotok i Baltik) (Seddon i Ellegren, 2002.; Seddon i Ellegren, 2004.), u Hrvatskoj (Arbanasić i sur., 2013.) i Meksiku (Hedrick i sur. 2000.), etiopijski vuk u Africi, (Kennedy i sur., 2011.), te usporedba crvenog vuka i kojota u Sjevernoj Americi (Hedrick i sur., 2002.). Međutim najviše istraživanja provedeno je domestificiranoj vrsti, psu pri čemu je otkriven velik broj alela (Kennedy i sur., 2000.; Kennedy i sur., 2002.a; Kennedy i sur., 1999.; Kennedy i sur., 1998.) što se objašnjava velikim brojem umjetno stvorenih pasmina (Seddon i Ellegren, 2002.), dok je unutar pasmina zabilježena niska genetička raznolikost kao posljedica parenja u srodstvu.

Kod vukova iz Skandinavije i Baltika analizirani su lokusi *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* MHC skupine II, te je pronađen velik broj raznolikih alela unatoč tome što su populacije prošle kroz usko grlo. Rezultat se pripisuje djelovanju ravnotežne selekcije i uvođenju alela iz okolnih populacija u Rusiji (Seddon i Ellegren, 2002.; Seddon i Ellegren, 2004.).

Isti lokusi analizirani su na vukovima iz Sjeverne Amerike. Rezultati su pokazali veću raznolikost populacije vukova iz Kanade u usporedbi s onima iz Aljaske. Utvrđen je veći broj nesinonimnih mutacija i neuravnoteženo vezivanje alela triju lokusa kao posljedica djelovanja selekcije na lokusima (Kennedy i sur., 2007.a).

Na uzorku od 77 jedinki vuka iz Hrvatske analizirana je raznolikost *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusa MHC skupine II, pri čemu je utvrđeno 13 *DRB*, 7 *DQA* i 11 *DQB* alela te 13 trolokusnih haplotipova. Istraženo je i djelovanje selekcije na analiziranim lokusima.

U istraživanju Hedrick i sur. (2000.) analiziran je samo *DRB1* lokus kod meksičkog vuka s ciljem utvrđivanja raznolikosti. Rezultati istraživanja pružaju smjernice za daljnje upravljanje populacijom nastalom od sedam reintroduciranih jedinki.

U sljedećem istraživanju od Hedrick i sur. (2002.) uspoređena je populacija crvenog vuka i kojota (prerijski vuk). Rezultati su pokazali da su *DRB* aleli sličniji onima u kojota nego u vuka što potvrđuje pretpostavku da je evolucijski razvoj crvenog vuka i kojota tekao neovisno o vuku (Bertorelle i Excoffier, 1998.; Wilson i sur. 2000.). Također su pronađeni dokazi djelovanja ravnotežne selekcije na lokusu, unatoč tome što je populacija u jednom periodu bila na rubu opstanka (Hedrick i sur., 2002.).

Kod etiopijskog vuka pronađeno je na *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusima MHC skupine II ukupno devet alela među kojima je utvrđena vrlo mala aminokiselinska razlika (Kennedy i sur., 2011.)

Kod male populacije vukova u Italiji koja je dugo bila u izolaciji utvrđena je visoka raznolikost *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusa MHC skupine II i visoki omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija (Galaverni i sur., 2013.).

Istraživanje na afričkom divljem psu (*Lycaon pictus*) pokazalo je značajno smanjenu raznolikost MHC lokusa. Na *DQA1* i *DQB1* pronađena su 1-2 alela, dok je na *DRB1* lokusu pronađeno 17 alela. Aminokiselinske udaljenosti bile su znatno manje nego kod ostalih dosad istraženih pripadnika porodice Canidae (Marsden i sur., 2009.).

2.4. Istraživanja na čaglju

Čagalj je jedna od najmanje istraživanih vrsta unatoč svojoj širokoj rasprostranjenosti u Europi, Aziji i Africi. Ovo je prvo istraživanje glavnoga sustava tkivne podudarnosti u čaglja. Dosadašnja istraživanja na čaglju provedena su jedino na neutralnim biljezima.

U istraživanju Zachos i sur. (2009.) na uzorku od 121 jedinke čaglja iz Srbije analiziran je dio kontrolne regije mitohondrijske DNA i osam mikrosatelitskih biljega (STR, engl. *short tandem repeat*). Rezultati mtDNA CR1 pokazali su izostanak raznolikosti, odnosno kod svih je jedinki pronađen isti haplotip, dok su mikrosatelitski lokusi polimorfni, ali su pokazali vrlo malu raznolikost. Rezultati ukazuju na učinak uskog grla (engl. *bottleneck effect*) na nedavno uspostavljenu populaciju čaglja u Srbiji. U spomenutom istraživanju analiziran je i jedan uzorak čaglja iz Austrije za kojega je utvrđeno da je genetički istovjetan čaglju iz Srbije. Pretpostavlja se da je jedinka migrirala iz Srbije unatoč uvriježenoj pretpostavci da čagalj u Italiji, Sloveniji i Austriji potječe iz Istre (Kryštufek i sur., 1997.). Također, rezultat može ukazivati i na visoku genetičku uniformnost balkanskog čaglja.

Fabbri i sur. (2014.) istraživali su hipervarijabilni dio kontrolne regije mitohondrijske DNA (mt DNA CR1) i petnaest autosomalnih mikrosatelitskih markera na uzorku od 121 jedinke čaglja iz Bugarske, Srbije, sjeveroistočne Italije i Hrvatske (Dalmacija i Slavonija). Rezultati su pokazali da svi uzorci pripadaju istom mtDNA CR1 haplotipu kao i čagalj iz Srbije (Zachos i sur., 2009.). Za razliku od mtDNA CR1 mikrosatelitski lokusi su polimorfni, ali je uočena niska raznolikost. Usporedbom čaglja s različitih područja uočeno je da se populacija čaglja iz Dalmacije genetički razlikuje od ostalih populacija, dok je čagalj iz Slavonije genetički sličniji čaglju iz Srbije, što ukazuje na postojanje dvije različite populacije čaglja u Hrvatskoj, različitog podrijetla. Također je uočeno miješano podrijetlo talijanskih jedinki od dalmatinskog i slavonskog čaglja.

Dok su dosadašnja istraživanja ukazala na nisku genetičku raznolikost europskog čaglja istraživanje Cohen i sur. (2013.) pokazalo je suprotno na populaciji azijskog čaglja. Analizirana je mtDNA i 13 mikrosatelitskih lokusa na uzorku od 88 jedinki čaglja i 85 jedinki crvenih lisica (*Vulpes vulpes*) iz pet različitih regija Izraela s ciljem utvrđivanja genetičke raznolikosti populacija. Rezultati pokazuju visok stupanj raznolikosti kod obje vrste unatoč činjenici da je čagalj na tom području bio gotovo istrijebljen. Kod obje vrste pronađene su razlike između

životinja u središnjem dijelu Izraela u usporedbi s onima na sjeveru i jugu Izraela, što ukazuje na izolaciju središnjih populacija, vjerojatno uslijed fragmentacije staništa.

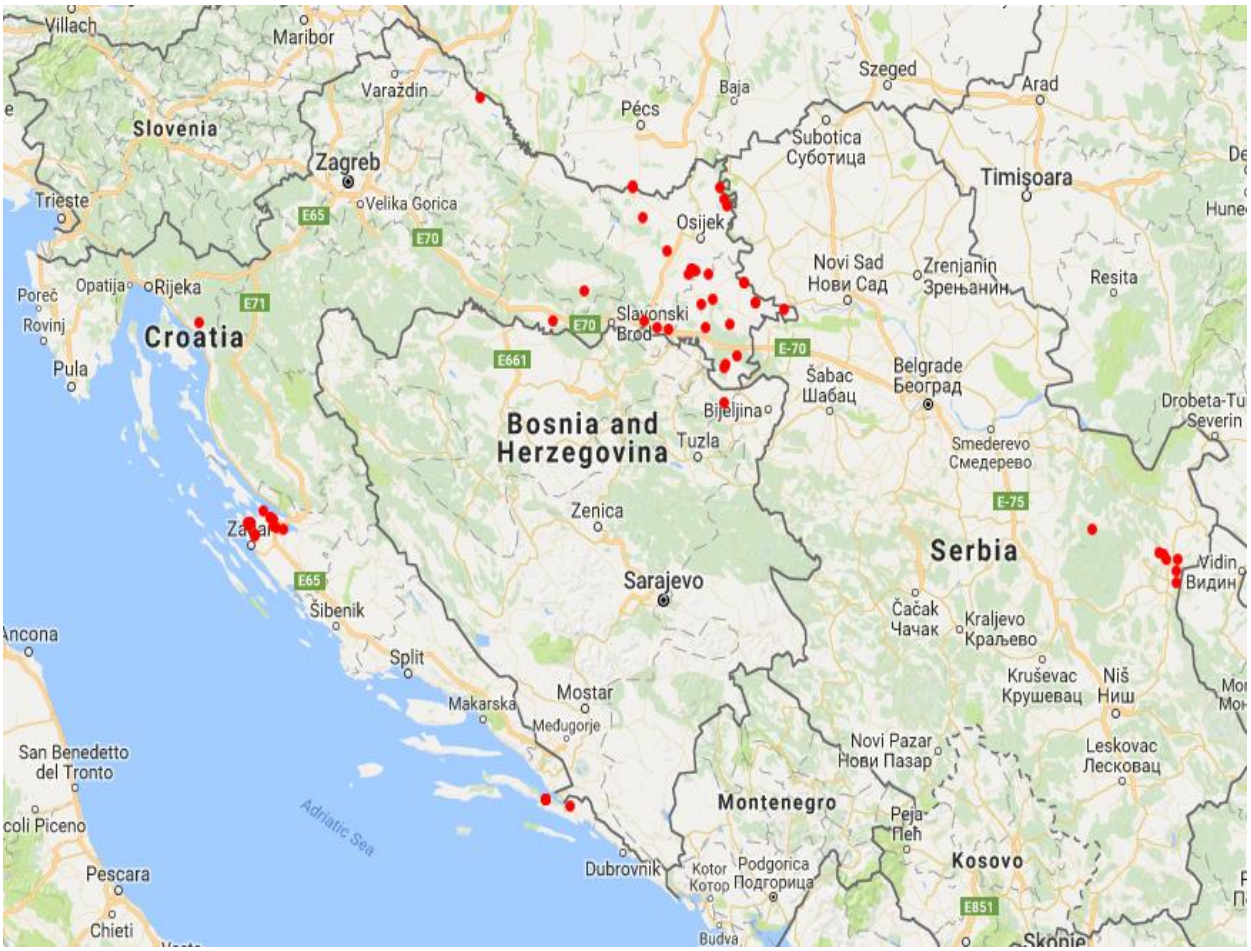
Rutkowski i sur. (2015.) analizirali su mtDNA i mikrosatelitne markere na 97 jedinki čaglja iz Rumunjske, Hrvatske, Slovenije, Ukrajine, Srbije, Mađarske, Grčke, Baltičkih zemalja i s Kavkaza. Pronađena su četiri mtDNA CR1 haplotipa i 102 alela na 15 mikrosatelitskih lokusa što ukazuje na nešto veću genetičku raznolikost čaglja, ali se smatra da je genetička raznolikost čaglja ipak niska s obzirom na to da je istraživanjem obuhvaćeno veliko geografsko područje. Populacije čaglja iz Dalmacije i Peloponeza razlikuju od ostalih europskih populacija, što je najvjerojatnije posljedica njihove dugotrajne izolacije. Također, rezultati ukazuju na to da je pojava čaglja na Baltičkom području posljedica širenja čaglja s Kavkaza i jugoistočne Europe. S obzirom na dvojno podrijetlo baltičkog čaglja smatra se da čagalj nije strana invazivna vrsta unesena ljudskim čimbenicima već je pojava čaglja na novim područjima posljedica prirodnog širenja vrste koja osniva nove populacije na većoj geografskoj udaljenosti od matičnih populacija.

Istraživanje Galov i sur. (2015.) potvrdilo je postojanje fertilnih hibrida domaćeg psa i čaglja. U istraživanju su analizirani biparentalni (autosomalni mikrosatelitni lokusi, trolokusni *DRB1/DQA1/DQB1* haplotip) i uniparentalni genetički markeri (mitohondrijska kontrolna regija i *Zfy* intron). Identificirana su 3 hibrida od kojih je svaki imao po jedan pseći i jedan čagljevski MHC trolokusni haplotip.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci tkiva čaglja

U istraživanju sam koristila uzorke tkiva čaglja koji su sakupljeni s leševa životinja nađenih ili ustrijeljenih na području Slavonije i Dalmacije u Hrvatskoj, te u Srbiji (Slika 7., Tablica 3.) u periodu od 2002. do 2014. godine.



Slika 7. Mjesta nalaza čaglja

Tablica 3: Podaci o uzorcima čaglja korištenima u istraživanju.

Redni broj	Oznaka jedinke	Spol	Datum nalaza	Mjesto nalaza	Regija nalaza
1.	J01	f	03.01.2002.	Novi Vinodolski	Dalmacija
2.	J02	m	31.02.2002.	Bokanjačko blato	Dalmacija
3.	J03	f	31.03.2002.	Ston	Dalmacija
4.	1c	m	07.02.2009.	Tompojevci	Slavonija
5.	2c	m	05.08.2008.	Šodolovci	Slavonija
6.	3c	f	16.11.2008.	Cerna	Slavonija
7.	4c	m	01.08.2008.	D. Miholjac	Slavonija
8.	6c	f	01.09.2008.	Davor	Slavonija
9.	7c	f	10.10.2008.	Drenovci	Slavonija
10.	8c	f	15.08.2008.	D. Miholjac	Slavonija
11.	9c	m	10.11.2008.	Drenovci	Slavonija
12.	10c	f	19.10.2008.	Šodolovci	Slavonija
13.	11c	m	23.10.2008.	Vukovar	Slavonija
14.	12c	m	22.01.2009.	Ludoš	Slavonija
15.	13c	f	14.09.2008.	Davor	Slavonija
16.	14c	m	30.01.2009.	Laslovo	Slavonija
17.	15c	f	01.05.2008.	Šodolovci	Slavonija
18.	16c	f	10.01.2009.	Zlatna greda	Slavonija
19.	17c	m	11.02.2009.	Kunjevci	Slavonija
20.	18c	f	18.01.2009.	Novi grad	Slavonija
21.	19c	m	28.11.2008.	Lacići	Slavonija
22.	20c	f	20.11.2008.	Vukovar	Slavonija
23.	21c	f	05.06.2008.	Tompojevci	Slavonija
24.	22c	f	04.04.2008.	Novi grad	Slavonija
25.	23c	m	21.03.2008.	Novi grad	Slavonija
26.	24c	m	09.03.2008.	Vladislavci	Slavonija
27.	25c	m	07.10.2008.	Šodolovci	Slavonija
28.	26c	m	08.03.2008.	Vrbanja	Slavonija
29.	27c	m	23.04.2008.	Kešinci	Slavonija
30.	28c	f	21.06.2008.	Sikirevci	Slavonija

Tablica 3. – nastavak

31.	29c	m	23.06.2008.	Ilok	Slavonija
32.	30c	f	05.05.2008.	Oprisavci	Slavonija
33.	31c	f	28.02.2009.	Otok	Slavonija
34.	33c	f	09.01.2009.	Cerna	Slavonija
35.	34c	m	23.01.2010.	Drenovci	Slavonija
36.	35c	m	03.12.2009.	Ludoš	Slavonija
37.	36c	m	12.01.2009.	Posedarje	Dalmacija
38.	37c	f	14.01.2009.	Posedarje	Dalmacija
39.	38c	m	14.01.2009.	Posedarje	Dalmacija
40.	39c	m	17.01.2010.	Koprivnica	Slavonija
41.	40c	m	21.02.2010.	Zadar	Dalmacija
42.	41c	f	21.02.2010.	Zadar	Dalmacija
43.	42c	m	21.02.2010.	Zadar	Dalmacija
44.	43c	m	21.02.2010.	Zadar	Dalmacija
45.	44c	m	21.02.2010.	Zadar	Dalmacija
46.	45c	f	27.02.2010.	Posedarje	Dalmacija
47.	46c	f	27.02.2010.	Posedarje	Dalmacija
48.	47c	m	27.02.2010.	Posedarje	Dalmacija
49.	48c	m	27.02.2010.	Posedarje	Dalmacija
50.	50c	m	15.01.2010.	Žagubica	Srbija
51.	51c	f	14.01.2010.	Zaječar	Srbija
52.	52c	m	14.01.2010.	Zaječar	Srbija
53.	53c	m	14.01.2010.	Zaječar	Srbija
54.	54c	f	14.01.2010.	Zaječar	Srbija
55.	55c	f	14.01.2010.	Zaječar	Srbija
56.	56c	m	14.01.2010.	Zaječar	Srbija
57.	61c	/	05.03.2012.	Pelješac	Dalmacija
58.	62c	/	05.03.2012.	Pelješac	Dalmacija
59.	67c	/	31.10.2013.	Pelješac	Dalmacija
60.	68c	/	31.10.2013.	Pelješac	Dalmacija
61.	69c	/	07.01.2014.	Pleternica	Slavonija

3.2. Izolacija DNA iz mišićnog tkiva

Za vrijeme razudbe uzet je uzorak mišićnog tkiva, te je pohranjen u epruvete s 96 % -tnim etilnim alkoholom. Tako uzeti uzorci su čuvani na -20 ºC, na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Ukupna DNA izolirana je iz uzoraka tkiva čaglja pomoću komercijalnog kita Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega.

3.3. Genotipizacija *DRB1, DQA1* i *DQB1* lokusa

3.3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za svaki uzorak sam provela tri odvojene lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Svaka reakcija je sadržavala specifične početnice za umnažanje eksona 2 na jednom od lokusa MHC skupine II (*DRB1*, *DQA1* i *DQB1*). Za lokuse *DRB1* i *DQA1* koristila sam početnice iz literature koje se uobičajeno koriste za porodicu pasa. Nizvodna početnica za *DQB1* lokus je osmišljena za ovo istraživanje. Koristila sam sljedeće početnice:

Za *DRB1* lokus:
DRBF (5'-gatccccccgtccccacag-3') (Kennedy i sur., 2005.)
i DRB1R (5'-tgtgtcacacacctcagcacca-3') (Wagner i sur., 1996.a)

Za *DQA1* lokus:
DQAin1 (5'-taaggttcttttctccctct-3') (Wagner i sur., 1996.b)
i DQAIn2 (5'-ggacagattcagtgaagaga-3') (Wagner i sur., 1996.b)

Za *DQB1* lokus:
DQB1BT7 (5'-ctcactggcccggctgtctc-3') (Kennedy i sur., 2002.)
i DQBR3 (5'-acctgggtggggagcccg-3')

Koristila sam prethodno pripremljene „stock“ otopine početnica u deioniziranoj vodi, koncentracije 100 μM, koje su čuvane na -20 °C, a od njih sam dalje radila „radne“ otopine početnica, svaku u koncentraciji od 5 μM. Za PCR reakcije sam koristila QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN GmbH Germany) koji se sastoji od „Master Mix“ otopine koja sadrži optimizirane koncentracije HotStarTaq DNA polimeraze, $MgCl_2$, dNTP-e i PCR pufera koji ima uravnoteženu kombinaciju soli i dodataka. Svaka PCR reakcija sadržavala je 150 – 250 ng kalupa DNA.

Svaka PCR reakcija sadržavala je:

12,5 µl Qiagen Master Mix

2,5 µl Q otopine

1 µl otopine uzvodne početnice (5 µM)

1 µl otopine nizvodne početnice (5 µM)

7 µl destilirane vode

1 µl DNA kalupa

Ukupni volumen jedne PCR smjese bio je 25 µl, a pripremila sam ga tako da sam napravila „stock" otopinu koja sadržavala Qiagen Master Mix, Q otopinu, uzvodnu početnicu, nizvodnu početnicu i destiliranu vodu, sve u umnošku volumena koji je potreban za jednu PCR reakciju i broja PCR reakcija plus još jedna dodatna PCR reakcija. U svaku tubicu sam odpipetirala po 24 µl pripremljene „stock" otopine, te sam na kraju u svaku tubicu odpipetirala po 1 µl odgovarajućeg DNA kalupa (uzorak). PCR reakcije sam provodila u plastičnim tubicama od 0,2 ml, MicroAmp Reaction Tubes (8 Tubes/Strip) i MicroAmp Caps (8 Caps/Strip), Applied Biosystems. PCR reakcije su se odvijale u uređaju GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Tablica 4. prikazuje uvjete PCR reakcija.

Tablica 4. Optimizirani uvjeti izvođenja PCR reakcija (temperatura i trajanje svakog koraka, te broj ciklusa) za pojedini lokus.

	DRB1	*DQA1*	*DQB1*
Početna aktivacija polimeraze		95 °C, 15 min	
		14 ciklusa	
Denaturacija	95 °C, 15 min.	95 °C, 30 s	95 °C, 30 s
Prianjanje početnica	62 °C, 1 min. *	54 °C, 1 min. *	73 °C, 1 min. *
Produljenje lanca	72 °C, 1 min.	72 °C, 1 min.	72 °C, 1min.
		20 ciklusa	
Denaturacija	95 °C, 30 s	95 °C, 30 s	95 °C, 30 s
Prianjanje početnica	55 °C, 1 min.	47 °C, 1 min.	66 °C, 1 min.
Produljenje lanca	72 °C, 1 min.	72 °C, 1 min.	72 °C, 1 min.
Konačno produljenje umnoženih sljedova DNA	72 °C, 10 min.	72 °C, 10 min.	72 °C, 10 min.

* uz spuštanje temperature za 0,5 °C u svakom ciklusu

Dobiveni su PCR proizvodi duljine od 246 pb za *DQA1* lokus, te 267 pb za *DRB1* i *DQB1* lokuse koje sam pohranjivala na 4 °C do daljnje analize.

3.3.2. Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu

Uspješnost PCR reakcija utvrdila sam elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu. Agarozni gel sam pripremila otapanjem 0,5 g agaroze (CertifiedTM PCR Agarose, Bio-Rad, SAD) u 50 ml 0,5X TBE pufera, uz postupno zagrijavanje do vrenja dok se sva agaroza nije potpuno otopila. U otopinu agaroze dodala sam boju SYBR®Safe DNA gel stain (Invitrogen). Nakon hlađenja otopinu agaroze sam premjestila u kalup u koji sam postavila češalj za jažice. Gel se kroz kratko vrijeme na sobnoj temperaturi polimerizirao. Nakon polimerizacije iz gela sam uklonila češalj, a gel sam premjestila u kadicu za elektroforezu koja je sadržavala 0,5X TBE pufer. PCR proizvode sam pripremila za elektroforezu na sljedeći način. Na parafilm sam nanijela po 4,5 µl svakog PCR proizvoda i 3 µl pufera (LB pufer, engl. *loading buffer*) koji sadrži 0,25 % bromfenol plavila, 0,25 % ksilencijanol fluorofosfata i 15 % fikola. Tako pripremljene uzorke nanijela sam u jažice na gelu, pazeći pritom na redoslijed uzoraka koji sam zabilježila. Uz PCR proizvode u jednu od jažica sam nanijela biljeg veličine DNA fragmenata koji se sastoji od 10 dvolančanih DNA molekula veličina 100 pb, 200 pb, 300 pb itd., do 1500 pb (100 bp Molecular Ruler, 100 µg/ml, Bio-Rad, SAD). Osim biljega na gel sam nanijela i pozitivnu i negativnu kontrolu PCR-a. Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi, pri naponu od 90 V u trajanju od 30 minuta. Nakon završene elektroforeze gelove sam promotrila u transiluminatoru. Elektroforezom sam provjerila da li je došlo do umnažanja istraživanog fragmenta ili nije, te da li su se pojavili dodatni, nespecifični fragmenti.

3.3.3. Pročišćavanje PCR proizvoda

Prije sekvenciranja potrebno je pročistiti PCR proizvode, što uključuje uklanjanje neiskorištenih nukleotida i početnica. Uspješno umnožene fragmente pročistila sam pomoću komercijalnog kita Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega. U svaki PCR produkt odpipetirala sam jednaki volumen otopine *Membrane Binding Solution*. Ukupni volumen pripremljene otopine prebacila sam u kolonu, inkubirala 1 minutu te centrifugirala 1 minutu na 14000 rpm. Pritom se DNA iz otopine vezala na membranu kolone. Odstranila sam kolonu, kao i tekućine iz epruvete te sam vratila kolonu u epruvetu. Zatim sam u kolonu odpipetirala 700 µl

Membrane Wash Solution i centrifugirala 1 minutu na 1400 rpm, ponovno uklonila tekućinu iz epruvete i vratila kolonu. Ponovno sam odpipetirala *Membrane Wash Solution* u kolonu u volumenu od 500 µl i centrifugirala 5 minuta na 14000 rpm i uklonila tekućinu iz epruvete. Ponovila sam centrifugiranje 1 minutu na 14000 rpm (bez metalnog poklopca) i prebacila kolonu u novu, prethodno označenu epruvetu. U kolonu sam dodala 50 µl *Nuclease-Free Water*, inkubirala 1 minutu i centrifugirala 1 minutu na 14000 rpm. U ovom koraku došlo je do elucije, odnosno ispiranja DNA s membrane kolone u epruvetu, te sam kolonu bacila. Epruvetu s pročišćenom DNA pohranila sam na 4 °C.

3.3.4. Sekvenciranje

Pročišćene PCR proizvode poslala sam na sekvenciranje u servis „Macrogen“. Za reakcije sekvenciranja korištene su iste početnice kao i za PCR reakcije. U navedenom servisu korišten je 96-kapilarni genski analizator „ABI3730xl DNA Analyzer“, Applied Biosystems.

3.3.5. Analiza rezultata sekvenciranja

Dobivene nukleotidne sljedove provjerila sam u programu BioEdit (Hall, 1999.). Na uspjelim sekvencama provedeno je višestruko sravnjenje sljedova DNA korištenjem implementiranog ClustalW programa (Thompson i sur., 1994.), te su identificirana polimorfna nukleotidna mjesta.

3.3.6. Identifikacija alela programom SeqScape

Budući da je genom čaglja diploidan, za svaki lokus postoje po dva alela, od kojih je svaki naslijeđen od jednog roditelja. Jedinke koje imaju dva ista alela su homozigoti, dok su jedinke koje imaju dva različita alela heterozigoti. Prilikom PCR reakcije dolazi do umnažanja oba alela. Za identifikaciju dobivenih alela korišten je SeqScape program (Applied Biosystems SeqScape® software). SeqScape razdvaja alele naslijeđene od svakog roditelja (gametne faze) i uspoređuje ih s referentnom knjižnicom u kojoj su pohranjeni svi poznati aleli za određeni lokus pojedine životinjske vrste. U slučaju da program ne pronađe alel koji se u potpunosti podudara s pohranjenim podacima, prikazuju se aleli s najmanjim brojem nepodudarnih nukleotidnih mjesta, a ako se ne pronađe podudarna kombinacija niti nakon ponovljenog PCR-a, pretpostavlja se da je otkriven novi alel.

3.4. Kloniranje odsječka DNA u plazmidnom vektoru TA kloniranjem

Cilj molekularnog kloniranja je umnažanje željenog dijela DNA. Molekularno kloniranje potrebno je provesti u svrhu identifikacije novih, do sad neutvrđenih alela. Metoda se temelji na unosu željenog odsječka DNA u bakterije koji se umnaža uslijed reprodukcije bakterija. Odsječak DNA prvo se ugrađuje u plazmid (vektor) koji se zatim unosi u bakterijsku stanicu. Da bismo provjerili da li su bakterije usvojile plazmid u podlogu se stavlja antibiotik ampicilin. Budući da plazmid uz željeni odsječak DNA nosi i gen za otpornost na ampicilin, na podlozi će rasti samo kolonije bakterija koje su usvojile plazmid. Radi provjere sadrži li ugrađeni plazmid željeni odsječak DNA provodi se plavo-bijela selekcija. Plazmid sadrži gen za jednu podjedinicu enzima galaktozidaze čiji supstrat x-gal (modificirana galaktoza) djelovanjem enzima daje plavo obojeni produkt. Plazmid je pocijepan na jednom mjestu tako da nije kružan već linearan, a DNA koja je predmet istraživanja spaja dva kraja plazmida u kružnu molekulu. Mjesto prekida plazmida je unutar gena za galaktozidazu. Ukoliko je plazmid zatvoren bez ugrađenog odsječka DNA te je gen za galaktozidazu cjelovit i funkcionalan, enzim će djelovati na supstrat uslijed čega će kolonije biti plave. Ukoliko je odsječak DNA ugrađen u plazmid, gen za enzim galaktozidazu bit će nefunkcionalan i neće djelovati na supstrat te će kolonije biti bijele.

Molekularno kloniranje je provedeno na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog Odsjeka PMF-a. U istraživanju je korišten kit pGEM® - T Vector System, Promega. Kit sadrži plazmidni vektor (pGEM® - T Vector), kontrolni insert DNA, T4 DNA ligazu, ligacijski pufer i JM109 kompetentne stanice.

3.4.1. Ligacija

Ligacija podrazumijeva ugrađivanje željenog odsječka DNA u plazmid. U plazmid se ugrađuje svjež i pročišćen PCR proizvod DNA odsječka koji je predmet analize. Ugradnja je olakšana time što je plazmid prekinut i na krajevima ima dodan timin, dok većina termostabilnih polimeraza koje se koriste za PCR, na kraj produkta dodaje adenin.

Osnovne komponente ligacijske reakcije su plazmid, DNA, enzim ligaza i priloženi pufer. Osim pokusnih reakcija, postavlja se pozitivna i negativna kontrola ligacije. Pozitivna kontrola služi procjeni uspješnosti procesa ligacije. Postavlja se sa priloženim kontrolnim insertom. Zbog ugradnje kontrolnog inserta u plazmid očekuju se većinom bijele kolonije. Plave kolonije su

rezultat nepocijepanog plazmida ili nedostatka timina na njegovim krajevima. U negativnoj kontroli nalazi se samo plazmid, bez dodane DNA. Plave kolonije koje nastaju rezultat su zatvaranja plazmida uslijed nepostojanja T krajeva ili postajanja nepocijepanih plazmida. Očekuje se malo plavih kolonija. Tablica 5. prikazuje ligacijsku reakciju.

Tablica 5. Prikaz ligacijske reakcije

Reagens	Uzorak	Pozitivna kontrola	Negativna kontrola
ligacijski pufer	5 µl	5 µl	5 µl
Vektor	1 µl	1 µl	1 µl
PCR proizvod	X* µl	-	-
kontrolni insert	-	2 µl	-
T4 DNA ligaza	1 µl	1 µl	1 µl
Voda	do 10 µl	do 10 µl	do 10 µl

* količina koja udovoljava potrebnom molarnom omjeru insert : vektor

Ligacijska reakcija inkubirana je preko noći na 4 °C.

3.4.2. Transformacija

Transformacija predstavlja unos plazmida u bakteriju. Koriste se kompetentne bakterije *Escherichia coli* što znači da su obrađene s ciljem usvajanja plazmida. Nakon postupka transformacije, bakterije se nasađuju na ploče sa krutom hranjivom podlogom koja je pripremljena prema preporuci proizvođača i sadrži ampicilin. Prije nasađivanja bakterija, na ploče se nanosi IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid) i X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid). IPTG je induktor gena za galaktozidazu, dok je X-gal supstrat galaktozidaze. Inkubacija bakterija na hranjivoj podlozi traje 16-24 sata na 37 °C. Transfomacija je provedena na sljedeći način:

1. Pripremljene su po dvije ploče sa hranjivom podlogom za uzgoj bakterija za svaku reakciju ligacije, te po jedna za pozitivnu i negativnu kontrolu ligacije. Korištena je LB (*lysogen*

broth) hranjiva podloga u koju je dodan ampicilin, IPTG i X-gal u koncentracijama prema uputama proizvođača.

2. Epruvete sa ligacijskom smjesom su centrifugirane. Po 2 µl ligacijske smjese iz svake pojedinačne reakcije izdvojeno je u nove, sterilne 1,5 ml epruvete koje su stavljene na led. U jednu epruvetu stavljeno je 0,1 ng nerazrezanog plazmida radi procjene učinkovitosti transformacije.
3. Nakon odmrzavanja i laganog miješanja po 50 µl kompetentnih bakterijskih stanica pažljivo je prebačeno u epruvete sa ligacijskom smjesom, a 100 µl u epruvetu sa nerazrezanim plazmidom.
4. Epruvete su ostavljene na ledu 20 min, potom su prebačene u vodenu kupelj temperature 42 °C na 45 – 50 sekundi, nakon čega su ponovno vraćene na led na 2 min.
5. U epruvete je dodano 950 µl tekućeg LB medija sa ampicilinom (a u epruvetu za efikasnost transformacije 900 µl) nakon čega je uslijedila inkubacija na temperaturi 37 °C uz trešnju 90 min.
6. Na pripremljene ploče sa hranjivom podlogom naneseno je po 100 µl odgovarajuće transformacijske smjese nakon čega je uslijedila inkubacija na 37 °C preko noći.

3.4.3. Umnažanje odabranih kolonija

Nakon inkubacije pojedinačne bijele kolonije su presađene u tekući medij s ciljem dodatnog umnožavanja DNA. Od svakog uzorka odabrano je po 8-10 bijelih kolonija i preneseno u zasebnu epruvetu s 5 ml tekućeg LB medija s ampicilinom. Epruvete su inkubirane na temperaturi od 37 °C uz trešnju preko noći.

3.4.4. Izdvajanje plazmida iz bakterija i pročišćavanje plazmida

Nakon umnažanja bakterija potrebno je izdvojiti plazmide. Postupak se sastoji iz dva dijela. Prvo se razara bakterijska stanica, pri čemu je potrebno izdvojiti plazmid od ostatka bakterijske DNA, nakon čega slijedi pročišćavanje izdvojenog plazmida. Za izdvajanje plazmida iz bakterija korišten je kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega. Kit sadrži otopine *Cell Resuspension Solution* (CRA), *Cell Lysis Solution* (CLA), *Neutralization Solution* (NSB), *Column Wash Solution* (CWA), *Alkaline Protease Solution*, *Nuclease-Free*

Water, te kolone i 2 ml tubice. Izdvajanje plazmida iz bakterije i pročišćavanje plazmida provedeno je na sljedeći način.

Izdvajanje plazmida iz bakterijske stanice

1. Bakterijske kulture su centrifugirane nakon čega je uklonjen supernatant.
2. Bakterijski talog resuspendiran je sa 250 µl CRA (*Cell Resuspension Solution*) otopine.
3. Bakterijske stanice lizirane su dodatkom 250 µl CLA (*Cell Lysis Solution*) otopine. Sadržaj epruvete je promiješan četiri puta laganim prevrtanjem.
4. U svrhu inaktivacije endonukleaza i ostalih proteina dodano je 10 µl otopine APS (*Alkaline Protease Solution*). Sadržaj epruvete je promiješan četiri puta laganim prevrtanjem i inkubiran na sobnoj temperaturi 5 minuta.
5. Dodano je 350 µl otopine NSB (*Neutralization Solution*) čime je uspostavljen neutralni pH otopine i zaustavljeno djelovanje APS. Sadržaj epruvete je promiješan četiri puta laganim prevrtanjem i centrifugiran 10 minuta na najvećoj brzini na sobnoj temperaturi.
6. Supernatant je prebačen u kolonu i centrifugiran 1 minutu na najvećoj brzini. Tim postupkom plazmid je vezan na membranu kolone.

Pročišćavanje plazmida

7. Uklonjena je tekućina nakon centrifugiranja, a kolona je vraćena u epruvetu.
8. Plazmid je ispran sa 700 µl otopine CWA (*Column Wash Solution*) nakon čega je uslijedilo centrifugiranje na najvećoj brzini 1 minutu.
9. Kolona je odstranjena kako bi se uklonila tekućina iz epruvete nakon čega je kolona vraćena u epruvetu.
10. Postupak je ponovljen sa je 250 µl otopine CWA nakon čega je uslijedilo centrifugiranje na najvećoj brzini 2 minute.
11. Kolona sa plazmidom je prebačena u drugu epruvetu.
12. Dodatkom 100 µl vode (*Nuclease-Free Water*) i centrifugiranjem na najvećoj brzini 1 minutu plazmid je s membrane kolone oboren u otopinu.
13. Kolona je bačena, a epruveta s pročišćenim plazmidom DNA pohranjena na 4 °C.

3.4.5. Sekvenciranje produkata kloniranja

Produkti kloniranja sekvencirani su na isti način kao i PCR proizvodi. Sekvenciranje je obavljeno u oba smjera. Dobivene sekvence analizirala sam u BioEdit programu (Hall 1999.), a za identifikaciju dobivenih sekvenci koristila sam SeqScape program.

3.5. Utvrđivanje haplotipova

Haplotipove koji su prisutni u uzorku utvrđivala sam na dva načina. Prvi način je bio izlučivanje korištenjem homozigotnih jedinki - sekvencijalni analitički proces (Kennedy i sur. 2002.b). Izlučene haplotipove dodatno sam provjerila programom Arlequin 3.11 (Excoffier i sur. 2005.), pomoću ELB algoritma, pseudo-Bayesovog pristupa za procjenu gametnih faza.

3.6. Hardy-Weinbergova ravnoteža

Istražila sam djelovanje selekcije testiranjem Hardy-Weinbergove ravnoteže. Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže procijenila sam korištenjem programa Arlequin 3.5. (Excoffier i sur. 2005), pomoću egzaktnog testa korištenjem Markovljevih lanaca. Testirala sam Hardy-Weinbergovu ravnotežu na svim lokusima i haplotipovima.

3.7. Odabir modela supstitucije

Program MEGA koristila sam za odabir najboljeg modela nukleotidne i aminokiselinske supstitucije za alele svakog pojedinačnog lokusa analizom *Model Selection*. Analiza koristi statističku metodu *Maximum Likelihood*. Modeli s najnižim Bayesovim informacijskim kriterijem *(Bayesian Information Criterion)* smatraju se najprikladnijim supstitucijskim modelima. Odabrane modele koristila sam u analizama evolucijske udaljenosti među nukleotidnim i aminokoselinskim slijedovima, te za izradu filogenetskih stabala.

Evolucijske udaljenosti računala sam među alelima pojedinog lokusa pronađenima na istraženom uzorku, dok sam za izradu filogenetskih stabala koristila veći broj alela pronađenih kod divljih vrsta iz porodice Canidae.

Nukleotidnu udaljenost određivala sam za četiri utvrđena alela *DRB1* lokusa prema modelu Tamura 3-parameter s gama distribucijom (T92+G). Za *DQA1* lokus nukleotidnu udaljenost određivala sam za dva utvrđena alela prema Jukes-Cantor modelu (JC), a isti model je korišten i za tri alela *DQB1* lokusa.

Za računanje nukleotidnih evolucijskih udaljenosti koje su poslužile kao temelj za izradu filogenetskih stabala alela *DRB1* i *DQA1* lokusa, koristila sam Kimura 2-parametar model s gama distribucijom (K2+G). Za izradu filogenetskog stabla alela *DQB1* lokusa upotrijebila sam Jukes-Cantor model nukleotidne supstitucije sa gama distribucijom (JC+G).

Za računanje evolucijske udaljenosti među aminokiselinskim sljedovima pronađenim u istraživanom uzorku za *DQA1* i *DQB1* lokus koristila sam Jones-Taylor-Thornton model (JTT) (Tamura i sur. 2011). Za *DRB1* lokus koristila sam Jones-Taylor-Thornton model sa gama distribucijom (JTT+G).

T92 model u obzir uzima nejednak udio različitih nukleotida u sekvenci, a T92+G, ugrađuje i gama parametar (G). Gama parametar pretpostavlja da varijacije u učestalosti supstitucija među različitim nukleotidnim mjestima imaju oblik gama distribucije.

3.8. Evolucijske udaljenosti među alelima

Evolucijske udaljenosti među alelima određuju se prema broju nukleotidnih i aminokiselinskih supstitucija, a koriste se u istraživanjima molekularne evolucije i određivanju filogenetskih odnosa. Nukleotidne evolucijske udaljenosti računala sam za alele koje sam na pojedinom lokusu pronašla u istraženom uzorku, a aminokiselinske udaljenosti za pripadajuće aminokiselinske sljedove.

U programskom paketu MEGA7 koristila sam analizu *Distance, Compute Overall Mean Distance*, te sam u svakoj od analiza odredila srednju evolucijsku udaljenost i pripadajuće standardne pogreške.

3.9. Filogenetska analiza

Filogenetsku analizu provela sam za alele svakog pojedinačnog lokusa. Kod izrade filogenetskih stabala u obzir sam uzela alele pronađene u divljim vrstama iz porodice Canidae.

U genskim bazama GenBank i IPD – MHC Database pronašla sam alele vuka, crvenog vuka, etiopskog vuka, kojota i afričkog divljeg psa, kojima sam pridružila alele čaglja iz ovog istraživanja. Za izradu filogenetskog stabla DRB alela koristila sam 64 alela, za filogenetsko stablo *DQA* alela u obzir sam uzela 18 alela, dok sam za izradu filogenetskog stabla *DQB1* lokusa koristila 28 alela. Za alele sva tri istražena lokusa filogenetska stabla su konstruirana metodom *Maximum Likelihood*, uz primjenu Kimura 2-parameter modela za *DRB1* i *DQA1* lokus, te i Jukes-Cantor modela za *DQB1* lokus, uz gama distribucijski parametar. Statistička podržanost pojedinih grananja određena je *Bootstrap* metodom sa 1000 ponavljanja. Za sva tri stabla, kao vanjska skupina su uzeti ljudski HLA aleli pripadajućih lokusa.

3.10. Ispitivanje djelovanja selekcije na lokusima

Testovima selekcije utvrđuje se postojanje selekcije na određenim genima. Postojanje pozitivne selekcije na *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusima analizirala sam pomoću dva testa: dN/dS testom unutar programskog paketa MEGA i programom OmegaMap.

3.10.1. Test dN/dS

Test dN/dS test jedan je od uobičajenih testova za utvrđivanje djelovanja ravnotežne selekcije kroz evoluciju kod dva ili više nukleotidnih sljedova (Hill i Hastie, 1987.; Hughes i Nei, 1988.). Testom se utvrđuje omjer između nesinonimnih nukleotidnih mutacija, koje uzrokuju promjenu aminokiselinskog ostatka, i sinonimnih, koje ne mijenjaju proteinski produkt. Rezultati tog testa omogućuju nam određivanje vrste i razine selekcije na određenom lokusu. Ukoliko se nesinonimne i sinonimne nukleotidne supstitucije događaju s jednakom učestalošću (dN = dS) radi se o neutralnoj evoluciji. U slučaju usmjerene selekcije prevladavaju sinonimne supstitucije (dN/dS<1). Nesinonimne mutacije koje bi uvele promjene u protein, uklanjaju se iz populacije, stoga prevladavaju sinonime mutacije. Nasuprot tome, kod pozitivne selekcije koja rezultira većim brojem različitih alela u populaciji, veći je broj sinonimnih mutacija u odnosu na nesinonimne (dN/dS>1). Računalnom simulacijom pokazano je da je potrebno djelovanje ravnotežne selekcije tijekom stotina tisuća generacija da bi nakupljene mutacije pokazale njeno djelovanje primjenom dN/dS testa, a milijuni generacija su potrebni da se signal izgubi nakon što selekcija prestane djelovati (Garrigan i Hedrick, 2003.). Zbog toga je ovim testom moguće dobiti snažan dokaz o postojanju selekcije, ali nije moguće dobiti nikakvu informaciju o vremenu i uzroku djelovanja selekcije (Piertney i Oliver, 2006.).

Analizom dN/dS testa utvrđuje se vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze, odnosno pretpostavke da se radi o neutralnoj evoluciji (dN =d S), u korist alternativne hipoteze koja pretpostavlja djelovanje pozitivne selekcije.

Analizirala sam alele utvrđene na pojedinačnom lokusu. Koristila sam Nei-Gojobori metodu za određivanje broja sinonimnih i nesinonimnih supstitucija i njihovog omjera, te analizu *Codon-based Z-test of selection* za utvrđivanje statističke vjerojatnosti djelovanja pozitivne selekcije na određenom lokusu. (Nei i Gojobori, 1986.). Varijanca je izračunata *Bootstrap* metodom s 1000 ponavljanja.

3.10.2. OmegaMap

OmegaMap je program za otkrivanje prirodne selekcije i rekombinacije u DNA ili RNA sekvenci. Prisutnost pozitivne selekcije na pojedinačnim kodonima provjerila sam programom OmegaMap, za razliku od programskog paketa MEGA kojiprovjerava prisutnost selekcije na čitavom nukleotidnom slijedu. Pozitivna selekcija djeluje na visoko varijabilne dijelove nukleotidnog slijeda koji kodiraju vezna mjesta za antigene. Očekuje se da će pod djelovanjem pozitivne selekcije biti kodoni koji kodiraju vezna mjesta za antigen ili susjedni kodoni (Hughes i Nei, 1988.). Stoga je za određivanje prirodne selekcije značajniji pristup u kojem se analizira pojedinačni kodon, a ne čitav nukleotidni slijed. OmegaMap uzima u obzir i rekombinacije unutar lokusa MHC koje mogu utjecati na testove selekcije, procjenjujući učestalost rekombinacije i detektirajući selekciju u prisutnosti rekombinacije. Kao parametar selekcije, kao i programskom paketu MEGA, također se koristi omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija (ω=dN/dS). Pozitivna selekcija je prisutna na kodonu ukoliko je omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija (ω) veći od 1.

Postavke korištene tokom analize, prema preporuci autora (Wilson and McVean, 2006), bile su sljedeće: pomoću programa Order, uključenog u paket OmegaMap stvorena je lista nasumičnog poretka; stopa mutacije (μ) i stopa tranzicije/transverzije (κ) prilagođene su da slijede inverznu distribuciju s početnim vrijednostima 0.1 i 3.0; stopa rekombinacije (ρ) i parametar selekcije (ω) prilagođeni su da slijede inverznu distribuciju u opsegu od 0.01 do 100 i od 0.01 do 20; ω je podešen zasebno za svaki kodon a ρ je prilagođen modelu s po 10 naznačenih kodona. Svaki lokus podvrgnut je analizi s 500,000 ponavljanja. Program odbacuje prvih 10% rezultata zbog

nevjerodostojnosti. Završni korak je sabiranje dobivenih podataka pomoću programa *Summarise*.

3.11. Izračun alelnog bogatstva (engl. *allelic richness*)

Alelno bogatstvo je mjera broja alela neovisno o veličini uzorka za svaki lokus i populaciju. Za izračun alelnog bogatstva koristila sam program FSTAT (Goudet, 2002.). FSTAT je računalni paket koji se koristi za analizu genske raznolikosti i statističke diferencijacije na koodminantnim genetičkim markerima. Alelno bogatstvo procijenjeno je primjenom metode razrjeđivanja (engl. *rarefaction method*), kojom se svaki uzorak svede na veličinu najmanjeg uzorka. Analizirala sam alelno bogatstvo *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusa na uzorku od 61 jedinke čaglja iz ovog istraživanja i 77 jedinki vuka (Arbanasić i sur., 2013.) s obzirom da se radi o različitim ali srodnim vrstama.

3.12. Analiza rekombinacija

U svrhu utvrđivanja prisutnosti rekombinacija među alelima MHC lokusa koristila sam program RDP4 (*Recombination detection program*) koji koristi brojne algoritme za otkrivanje i procjenu rekombinacijskih događaja među odsječcima DNA. U okviru RDP programa moguće je izabrati algoritme RDP BootScan (Salminen i sur., 1995.; Martin i sur., 2005.), GENECONV (Padidam i sur., 1999.), MAXCHI (Maynard Smith, 1992.; Posada i Crandall, 2001.), CHIMAERA (Posada i Crandall, 2001.), SISCAN (Gibbs i sur., 2000.), 3SEQ (Boni i sur., 2007.), VisRD (Lemey i sur., 2009.) i BURT metodu. Provjerila sam prisutnost rekombinacija među alelima svakog lokusa.

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike lokusa

Istraženi se uzorak sastojao od 61 jedinke čaglja. Istraživala sam alele prisutne na lokusima *DRB1*, *DQA1* i *DQB1*, koji pripadaju skupini II glavnoga sustava tkivne podudarnosti. Za svaki lokus istražen je ciljni dio, ekson 2, koji kodira domenu receptora odgovornu za vezanje antigena. U istraženoj populaciji otkriveno je sedam novih alela, dok su ostali opisani u dosadašnjim istraživanjima i osam novih haplotipova, tipičnih za čaglja.

4.1.1. *DRB1* lokus

Istražila sam ekson 2 *DRB1* lokusa duljine 267 pb. *DRB1* lokus uspješno sam umnožila kod svih istraživanih jedinki. U uzorku sam pronašla četiri *DRB* alela. Među njima tri su alela utvrđena po prvi put, dok je jedan već ranije utvrđen. Alel *DRB1*00901* pronađen je kod vuka iz Sjeverne Amerike (Kennedy i sur., 2007.b) i kod više od 25 različitih pasmina pasa (Kennedy i sur., 2007.a). Novootkriveni aleli *DRB1*13001*, *DRB1*04503* i *DRB1*13101*, tipični su za čaglja i nisu utvrđeni niti na jednoj drugoj vrsti iz porodice Canidae.

Određivanjem učestalosti dobivenih alela *DRB1* lokusa utvrdila sam da je *DRB1*00901* najučestaliji alel u istraženoj populaciji čagalja s frekvencijom od 47,54 %, dok je alel s najmanjom frekvencijom od 5,74 % alel *DRB1*04503*. Svi aleli pronađeni su u homozigotnom i heterozigotnom obliku. Tablica 6. prikazuje pronađene *DRB* alele, apsolutan broj pojedinog alela, njegovu frekvenciju u populaciji i broj jedinki kod kojih je pojedini alel pronađen u homozigotnom i heterozigotnom obliku. U istraženoj populaciji čaglja najučestaliji alel *DRB1*00901* utvrđen je kod 42 jedinke. Taj se alel u homozigotnom obliku pojavljuje kod 16 jedinki, a u heterozigotnom kod 26 jedinki čaglja. Slijedi alel *DRB1*13001* utvrđen kod 30 jedinki, od čega kod 7 jedinki u homozigotnom obliku i 23 jedinke u heterozigotnom obliku. Alel *DRB1*13101* utvrđen je kod 17 jedinki, od čega u homozigotnom obliku kod 3 jedinke, a u heterozigotnom kod 14 jedinki. Alel sa najmanjom učestalošću *DRB1*04503* utvrđen je kod 6 jedinki, od čega samo u jedne u homozigotnom obliku, a u 5 jedinki u heterozigotnom obliku.

Tablica 6. *DRB* aleli utvrđeni u istraženoj populaciji čaglja, njihova učestalost, apsolutan broj, te broj jedinki kod kojih je pojedini alel pronađen u homozigotnom i heterozigotnom obliku.

Alel	Apsolutan broj alela	Učestalost alela %	Broj jedinki homozigota	Broj jedinki heterozigota
*DRB1*00901*	58	47,54	16	26
*DRB1*13001*	37	30,33	7	23
*DRB1*13101*	20	16,39	3	14
*DRB1*04503*	7	5,74	1	5

Na Slici 8. prikazani su nukleotidni sljedovi sva četiri *DRB* alela utvrđena u istraženoj populaciji čaglja. Ukupan broj promjenjivih nukleotidnih mjesta među alelima je 30. Od toga je 19 nesinonimnih promjena koje rezultiraju promjenom aminokiseline.

```
                          *   *   **      **          *
DRB1*13101    CAT TTC TTG GAG GTG GCA AAG GCC GAG TGC CAT TTC ACC AAC  [ 42]

DRB1*13001    ... ... ... A.. A.. .T. ... TT. ... ... ... ... ... ...  [ 42]

DRB1*04503    ... ... ... ... A.. TT. ... T.. ... ... ... ... ... ...  [ 42]

DRB1*00901    ... ... ... ... ... ... ... T.. ... ... T.. ... ... ...  [ 42]


                                      * * *   ***     *       *
DRB1*13101    GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTC GTG GAA AGA CAC ATC TAT AAC  [ 84]

DRB1*13001    ... ... ... ... ... ... C.T C.. ATG ... G.. ... ... ...  [ 84]

DRB1*04503    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... T.. ... C.. ...  [ 84]

DRB1*00901    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... T.. ... C.. ...  [ 84]
```

Slika 8. Nukleotidni sljedovi *DRB* alela pronađenih u istraženoj populaciji čaglja. Nukleotidi identični onima u prvom redu prikazani su točkom. Nesinonimna promjenjiva nukleotidna mjesta označena su zvjezdicom (*).

```
                        **
DRB1*13101    CGG GAG GAG AAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC  [126]

DRB1*13001    ... ... ... TT. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [126]

DRB1*04503    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [126]

DRB1*00901    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [126]


DRB1*13101    CGG GCG GTC ACG GAG CTC GGG CGG CCC GAC GCT GAG TCC TGG  [168]

DRB1*13001    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [168]

DRB1*04503    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [168]

DRB1*00901    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [168]


                  *               *            *   *           *
DRB1*13101    AAC GGG CAG AAG GAG CTC TTG GAG CAG AGG CGG GCC GCG GTG  [210]

DRB1*13001    ... C.. ... ... ... ... ... ... .G. ... ... ... .A. ...  [210]

DRB1*04503    ... ... ... ... ... ... ... ... .G. .A. ... ... .A. ...  [210]

DRB1*00901    ... C.. ... ... ... T.. ... ... .G. .A. ... ... ... ...  [210]


                     ***                      *       ***
DRB1*13101    GAC ACC TAC TGC AGA CAC AAC TAC GGG GTG GGC GAG AGC TTC  [252]

DRB1*13001    ... ..G GTG ... ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ...  [252]

DRB1*04503    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ATT ... ... ...  [252]

DRB1*00901    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ATT ... ... ...  [252]


DRB1*13101    ACG GTG CAG CGG CGA  [267]

DRB1*13001    ... ... ... ... ...  [267]

DRB1*04503    ... ... ... ... ...  [267]

DRB1*00901    ... ... ... ... ...  [267]
```

Slika 8. – nastavak

Svaki od četiri alela na *DRB* lokusu translacijom daje jedinstveni aminokiselinski slijed, a prikazani su na Slici 9. Ukupan broj promjenjivih aminokiselinskih mjesta je 19.

```
DRB1*13101    HFLEVAKAEC HFTNGTERVR FVERHIYNRE ENVRFDSDVG EYRAVTELGR  [50]
DRB1*13001    ...KMV.F.. .......... LLM.D..... .F........ ..........  [50]
DRB1*04503    ....ML.S.. .......... ....Y.H... .......... ..........  [50]
DRB1*00901    .......S.. Y......... ....Y.H... .......... ..........  [50]

DRB1*13101    PDAESWNGQK ELLEQRRAAV DTYCRHNYGV GESFTVQRR [89]
DRB1*13001    .......R.. ....R...E. ..V.....R. ......... [89]
DRB1*04503    .......... ....RK..E. .......... I........ [89]
DRB1*00901    .......R.. .F..RK.... .......... I........ [89]
```

Slika 9. Aminokiselinski sljedovi za *DRB* alele prisutne u populaciji čaglja. Aminokiseline identične onima u prvom redu označene su točkom (.)

4.1.2. *DQA1* lokus

Istražila sam ekson 2 *DQA1* lokusa duljine 246 pb. *DQA1* lokus uspješno sam umnožila kod svih jedinki. U uzorku sam pronašla dva *DQA* alela, od kojih je novootkriveni alel *DQA1*03001* tipičan za čaglja i nije utvrđen niti na jednoj drugoj vrsti iz porodice Canidae. Alel *DQA1*00402* već je ranije utvrđen na etiopskom vuku (*Canis simensis*) (Kennedy i sur., 2011.), te na nekoliko pasmina pasa (Kennedy i sur., 2007.b).

Alel s većom frekvencijom od 81,91 % je novootkriveni alel *DQA1*03001*, dok je drugi alel *DQA1*00402* frekvencije 18,03 %. Oba alela pronađena su u homozigotnom i heterozigotnom obliku. Tablica 7. prikazuje pronađene *DQA* alele, apsolutan broj pojedinog alela, njegovu frekvenciju u populaciji i broj jedinki kod kojih je pojedini alel pronađen u homozigotnom i heterozigotnom obliku. U istraženoj populaciji čaglja učestaliji alel *DQA1*03001* utvrđen je kod 57 jedinki. Taj se alel u homozigotnom obliku pojavljuje kod 43 jedinke, a u heterozigotnom kod 14 jedinki čaglja. Alel *DQA1*00402* utvrđen je kod 18 jedinki, od čega

kod 4 jedinke u homozigotnom obliku i 14 jedinki u heterozigotnom obliku. Slika 11. prikazuje učestalost *DQA* alela.

Tablica 7. *DQA* aleli utvrđeni u istraženoj populaciji čaglja, njihova učestalost, apsolutan broj, te broj jedinki kod kojih je pojedini alel pronađen u homozigotnom i heterozigotnom obliku.

Alel	Apsolutan broj alela	Učestalost alela %	Broj jedinki homozigota	Broj jedinki heterozigota
*DQA1*00402*	100	81,97	43	14
*DQA1*03001*	22	18,03	4	14

Na Slici 10. prikazani su nukleotidni sljedovi *DQA* alela utvrđenih u istraženoj populaciji čaglja. Ukupan broj promjenjivih nukleotidnih mjesta među alelima je 5. Od toga su 3 nesinonimne promjene koje rezultiraju promjenom aminokiseline.

```
DQA1*03001   GAC CAT GTT GCC TAC TAC GGC ATA AAT GTC TAC CAG TCT TAC  [ 42]
DQA1*00402   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [ 42]

DQA1*03001   GGT CCC TCT GGC CAG TAC ACC CAT GAA TTT GAT GGC GAT GAG  [ 84]
DQA1*00402   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [ 84]

             *
DQA1*03001   GAG TTC TAC GTG GAC CTG GAG AAG AAG GAA ACT GTC TGG CGG  [126]
DQA1*00402   TT. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [126]

                                         *
DQA1*03001   CTG CCT GTG TTT AGC ACA TTT GCA AGT TTT GAC CCA CAG GGT  [168]
DQA1*00402   ... ... ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ...  [168]
```

Slika 10. Nukletidni sljedovi *DQA* alela pronađenih u istraženoj populaciji čaglja. Nukleotidi identični onima u prvom alelu prikazani su točkom. Nesinonimna promjenjiva nukleotidna mjesta označena su zvjezdicom (*).

```
                                                *
DQA1*03001   GCA CTG AGA AAC TTG GCT ATA GCA AAA CAA AAC TTG AAC ATC  [210]
DQA1*00402   ... ... ... ... ... ... ... AT. ... ... ... ... ... ...  [210]

DQA1*03001   CTG ACT AAA AGG TCC AAC CAA ACT GCT GCT ACC AAT  [246]
DQA1*00402   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [246]
```

Slika 10. - nastavak

Oba *DQA* alela translacijom daju jedinstvene aminokiselinske slijedove, a prikazani su na Slici 11. Ukupan broj promjenjivih aminokiselinskih mjesta je 3.

```
DQA1*03001    DHVAYYGINV YQSYGPSGQY THEFDGDEEF YVDLEKKETV WRLPVFSTFA  [50]
DQA1*00402    .......... .......... ........L. .......... .........T  [50]

DQA1*03001    SFDPQGALRN LAIAKQNLNI LTKRSNQTAA TN [82]
DQA1*00402    .......... ...I...... .......... .. [82]
```

Slika 11. Aminokiselinski sljedovi *DQA* alela prisutnih u populaciji čaglja. Aminokiseline identične onima u prvom redu označene su točkom (.)

4.1.3. *DQB1* lokus

Istražila sam ekson 2 *DQB1* lokusa duljine 267 pb. *DQB1* lokus uspješno sam umnožila kod svih jedinki. U uzorku sam pronašla tri *DQB* alela. Svi aleli su tipični čagljevski i nisu pronađeni niti kod jedne vrste iz porodice Canidae, te su po prvi puta utvrđeni u ovom istraživanju.

Određivanjem učestalosti dobivenih alela *DQB1* lokusa utvrdila sam da je *DQB1*02305* najučestaliji alel u istraženoj populaciji čagalja s frekvencijom od 81,15 %, dok je alel s najmanjom frekvencijom od 0,82 % novoutvrđeni alel *DQB1*000806*. Učestalost alela *DQB1*06801* je 18,03 %. Aleli *DQB1*02305* i *DQB1*06801* pronađeni su u homozigotnom i heterozigotnom obliku, dok je novootkriveni alel *DQB1*00806* pronađen samo u heterozigotnom obliku i to u samo jedne jedinke. Tablica 8. prikazuje pronađene *DQB* alele,

apsolutan broj pojedinog alela, njegovu frekvenciju u populaciji i broj jedinki kod kojih je pojedini alel pronađen u homozigotnom i heterozigotnom obliku. U istraženoj populaciji čaglja najučestaliji alel *DQB1*02305* utvrđen je kod 57 jedinki. Taj se alel u homozigotnom obliku pojavljuje kod 42 jedinke, a u heterozigotnom kod 15 jedinki čaglja. Alel *DQB1*06801* utvrđen kod 18 jedinki, od čega kod 4 jedinke u homozigotnom obliku i 14 jedinki u heterozigotnom obliku. Slika 14. prikazuje učestalost *DQB* alela pronađenih u ovom istraživanju.

Tablica 8. *DQB* aleli utvrđeni u istraženoj populaciji čaglja, njihova učestalost, apsolutan broj, te broj jedinki kod kojih je pojedini alel pronađen u homozigotnom i heterozigotnom obliku.

Alel	Apsolutan broj alela	Učestalost alela %	Broj jedinki homozigota	Broj jedinki heterozigota
*DQB1*02305*	99	81,15	42	15
*DQB1*06801*	22	18,03	4	14
*DQB1*00806*	1	0,82	0	1

Na slici 12. prikazani su nukleotidni sljedovi *DQB* alela utvrđenih u istraženoj populaciji čaglja. Ukupan broj promjenjivih nukleotidnih mjesta među alelima je 29. Od toga je 16 nesinonimnih promjena koje su rezultirale promjenom aminokiseline.

```
                                          **
DQB1*06801   GAT TTC GTG TAC CAG TTT AAG TTC GAG TGC TAT TTC ACC AAC  [ 42]
DQB1*02305   ... ... ... ... ... ... ... GG. ... ... ... ... ... ...  [ 42]
DQB1*00806   ... ... ... ... ... ... ... GG. ... ... ... ... ... ...  [ 42]


                                              * *  *  **
DQB1*06801   GGG ACG GAG CGG GTG CGG CTT CTG GCG AGA AGC ATC TAT AAC  [ 84]
DQB1*02305   ... ... ... ... ... ... ... ... A.T .A. TA. ... ... ...  [ 84]
DQB1*00806   ... ... ... ... ... ... ... ... A.T .A. TA. ... ... ...  [ 84]
```

Slika 12. Nukletidni sljedovi *DQB* alela pronađenih u istraženoj populaciji čaglja. Nukleotidi identični onima u prvom alelu prikazani su točkom. Nesinonimna promjenjiva nukleotidna mjesta označena su zvjezdicom (*).

```
                          *                                           *
DQB1*06801   CGG GAG GAG TAC GTG CGC TTC GAT AGC GAC GTG GGG GAG TTC  [126]
DQB1*02305   ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ... .A.  [126]
DQB1*00806   ... ... ... .T. ... ... ... ..C ... ... ... ... ... .A.  [126]

                                                  ***
DQB1*06801   CGG GCG GTC ACG GAG CTC GGG CGG CCC TCG GCT GAG TAC TGG  [168]
DQB1*02305   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [168]
DQB1*00806   ... ... ... ... ... ... ... ... ... GAC ... ... ... ...  [168]

                 **            * *** *     *     ***
DQB1*06801   AAC GGG CAG AAG GAG ATC TTG GAG CGG AAG CGG GCC GAG CTG  [210]
DQB1*02305   ... CC. ... ... ..C GAG A.. ..C ... GTA ... ... ... ...  [210]
DQB1*00806   ... ... ... ... ..C GAG A.. ..C ... GTA ... ... ... ...  [210]

                                                  **              **
DQB1*06801   GAC ACG GTG TGC AGA CAC AAC TAC GGG GTG GAA GAG CTC TAC  [252]
DQB1*02305   ... ... ... ... ... ... ... ... ... T.. ... ... ... AC.  [252]
DQB1*00806   ... ... ... ... ... ... ... ... ... AG. ... ... ... AC.  [252]

             *
DQB1*06801   ACG TTG CAG CGG CGA  [267]
DQB1*02305   T.. ... ... ... ...  [267]
DQB1*00806   ... ... ... ... ...  [267]
```

Slika 12. - nastavak

Svaki od tri *DQB* alela translacijom daje jedinstvene aminokiselinske slijedove, a prikazani su na slici 13. Ukupan broj promjenjivih aminokiselinskih ostataka je 16.

```
DQB1*06801    DFVYQFKFEC YFTNGTERVR LLARSIYNRE EYVRFDSDVG EFRAVTELGR  [50]
DQB1*02305    .......G.. .......... ..TKY..... .......... .Y........  [50]
DQB1*00806    .......G.. .......... ..TKY..... .F........ .Y........  [50]

DQB1*06801    PSAEYWNGQK EILERKRAEL DTVCRHNYGV EELYTLQRR [89]
DQB1*02305    .......P.. DEMD.V.... .........L ...TS.... [89]
DQB1*00806    .D........ DEMD.V.... .........R ...T..... [89]
```

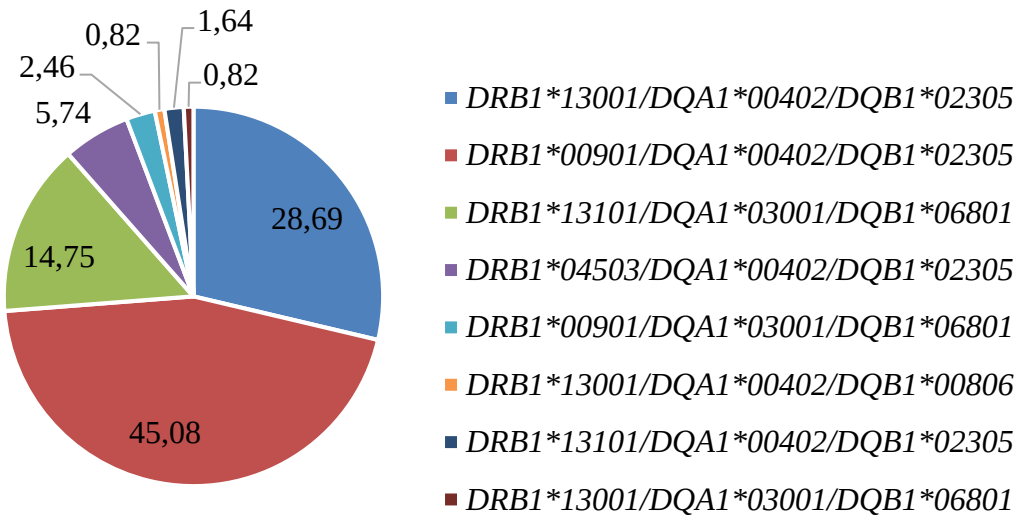
Slika 13. Aminokiselinski sljedovi za *DQB* alele prisutne u populaciji čaglja. Aminokiseline identične onima u prvom redu označene su točkom (.)

4.2. Haplotipovi *DRB1/DQA1/DQB1*

U istraženoj populaciji čaglja pronašla sam ukupno 8 trolokusnih *DRB1/DQA1/DQB1* haplotipova, i svi su tipični čagljevski. Tablica 9. prikazuje utvrđene haplotipove, njihovu frekvenciju i apsolutan broj u populaciji, kao broj jedinki kod kojih je utvrđen homozigotni haplotip. Haplotip s najvećom frekvencijom od 45,08 % je *DRB1*00901/DQA1*00402/DQB1*02305*, a u homozigotnom obliku dolazi kod 15 jedinki. Sljedeći je *DRB1*/13001/DQA1*00402/DQB1*02305* haplotip sa frekvencijom od 28,69 %, a u homozigotnom obliku je pronađen kod 7 jedinki. Slika 14. prikazuje učestalost haplotipova utvrđenih u ovom istraživanju. Učestalost haplotipa *DRB1*13101/DQA1*03001/DQB1*06801* je 14,75 %, a u homozigotnom obliku dolazi kod tri jedinke. Haplotip *DRB1*04503/DQA1*00402/DQB1*02305* frekvencije od 5,74 % u homozigotnom obliku nalazimo kod dvije jedinke. Svaki od rijetkih haplotipova *DRB1*00901/DQA1*03001/DQB1*06801*, *DRB1*13101/DQA1*00402/DQB1*02305*, *DRB1*13001/DQA1*03001/DQB1*06801* i *DRB1*13001/DQA1*00402/DQB1*00806* pronađen je u tri jedinke ili manje, s time da niti jedan nije pronađen u homozigotnom obliku.

Tablica 9. Utvrđeni trolokusni *DRB1/DQA1/DQB1* haplotipovi u istraženoj populaciji čaglja, njihova učestalost i apsolutan broj, te broj jedinki kod kojih je utvrđen homozigotni haplotip.

Trolokusni DRB1/DQA1/DQB1 haplotip	Apsolutan br. haplotipa	Učestalost haplotipa (%)	Broj jedinki homozigota
*DRB1*00901/DQA1*00402/DQB1*02305*	55	45,08	15
*DRB1*13001/DQA1*00402/DQB1*02305*	35	28,69	7
*DRB1*13101/DQA1*03001/DQB1*06801*	18	14,75	3
*DRB1*04503/DQA1*00402/DQB1*02305*	7	5,74	2
*DRB1*00901/DQA1*03001/DQB1*06801*	3	2,46	0
*DRB1*13001/DQA1*00402/DQB1*00806*	1	0,82	0
*DRB1*13101/DQA1*00402/DQB1*02305*	2	1,64	0
*DRB1*13001/DQA1*03001/DQB1*06801*	1	0,82	0



Slika 14. Učestalost utvrđenih haplotipova u istraženoj populaciji čaglja, izražena u postocima.

Od osam utvrđenih haplotipova, tri su haplotipa (*DRB1*04503/DQA1*00402/DQB1*02305*, *DRB1*13001/DQA1*00402/DQB1*00806*, *DRB1*13001/DQA1*03001/DQB1*06801*) pronađena isključivo kod jedinki čaglja iz Dalmacije, dok je jedan haplotip (*DRB1*00901/DQA1*03001/DQB1*06801*) pronađen isključivo kod jedinki iz Srbije (Tablica 10.).

Tablica 10. Utvrđeni trolokusni *DRB1/DQA1/DQB1* haplotipovi prikazani po regijama.

Haplotip	Dalmacija	Slavonija	Srbija
*DRB1*00901/DQA1*00402/DQB1*02305*	+	+	+
*DRB1*13001/DQA1*00402/DQB1*02305*	+	+	+
*DRB1*13101/DQA1*03001/DQB1*06801*	+	+	+
*DRB1*13101/DQA1*00402/DQB1*02305*	+	+	-
*DRB1*04503/DQA1*00402/DQB1*02305*	+	-	-
*DRB1*13001/DQA1*00402/DQB1*00806*	+	-	-
*DRB1*13001/DQA1*03001/DQB1*06801*	+	-	-
*DRB1*00901/DQA1*03001/DQB1*06801*	-	-	+

4.3. Testiranje odstupanja heterozigotnosti u odnosu na Hardy-Weinbergovu ravnotežu

Programom Arlequin testirala sam postoji li odstupanje u broju heterozigota u odnosu na Hardy-Weinbergovu ravnotežu. Analizirala sam pojedinačno genotipove na svakom lokusu i trolokusni haplotip. Tablica 11. prikazuje analizirane genotipove, očekivanu i dobivenu heterozigotnost, kao i P-vrijednosti testiranja nul hipoteze da je populacija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Za sve lokuse i haplotipove nije pronađeno odstupanje u odnosu na Hardy-Weinbergovu ravnotežu.

Tablica 11. Odstupanja heterozigotnosti u odnosu na Hardy-Weinbergovu ravnotežu

Lokus	H_O	H_E	P_{HWE}
DRB1	0,56	0,66	0,19
DQA1	0,23	0,30	0,09
DQB1	0,25	0,31	0,26
DRB1/DQA1/DQB1	0,59	0,70	0,10

H_O – uočena heterozigotnost
H_E – očekivana heterozigotnost
P_{HWE} – vjerojatnost odstupanja u odnosu na Hardy-Weinbergovu ravnotežu

4.4. Evolucijske udaljenosti među alelima

Evolucijske udaljenosti među *DRB, DQA* i *DQB* alelima određene su analizom njihovih nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova u MEGA računalnom programu, verzija 7. Program je izračunao i odabrao najprikladniji model nukleotidne i aminokiselinske supstitucije za svaki pojedini lokus. Za pojedine lokuse određeni su sljedeći modeli nukleotidne supstitucije: za *DRB1* lokus odabran je model T92+G, a za *DQA1* i *DQB1* lokus JC. Najprikladniji modeli za aminokiselinske supstitucije su sljedeći: za *DRB1* lokus JTT +G, a za *DQA1* lokus i *DQB1* JTT.

Iz Tablice 12. vidljivo je da je srednja nukleotidna evolucijska udaljenost najmanja među alelima *DQA1* lokusa (0,021), a najveća za alele *DRB1* lokusa (0,303). Za alele *DQB1* lokusa ona iznosi 0,078. Za *DQA1* lokus nađena je i najmanja srednja aminokiselinska udaljenost (0,039), a najveća je za *DRB1* lokus (0,830). Za *DQB1* lokus ona iznosi 0,149. Na svim lokusima vrijednosti aminokiselinskih udaljenosti veće su od vrijednosti nukleotidnih udaljenosti.

Tablica 12. Srednje vrijednosti evolucijskih nukleotidnih i aminokiselinskih udaljenosti među alelima za pojedini lokus (d), standardne pogreške (S.E.) i modeli za nukleotidne i aminokiselinske supstitucije koji su korišteni za pojedinu analizu.

Lokus	Nukleotidna udaljenost			Aminokiselinska udaljenost		
	Model nukleotidne supstitucije	D	S.E.	Model aminokiselinske supstitucije	d	S.E.
DRB1	T92+G	0,303	0,256	JTT+G	0,830	1,126
DQA1	JC	0,021	0,008	JTT	0,039	0,025
DQB1	JC	0,078	0,014	JTT	0,149	0,040

T92 – Tamura 3-parametar model nukleotidne supstitucije
JC – Jukes-Cantor model nukleotidne supstitucije
JTT – Jones-Taylor-Thornton model aminokiselinske supstitucije
G – parametar gama distribucije

4.5. Selekcija na lokusima

4.5.1. Test dN/dS

Omjere nesinonimnih i sinonimnih mutacija za *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokuse analizirala sam programom MEGA 7.0.26. Za analizu je korištena Nei-Gojobori metoda uz Jukes-Cantor korekciju. Standardne pogreške dobivene su bootstrap metodom uz 1000 ponavljanja i prikazane su u zagradama. Omjer dN/dS veći je od 1 za sva tri lokusa, što znači da je na svim lokusima prisutno više nesinonimnih od sinonimnih mutacija. Vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze (neutralna evolucija) u korist alternativne hipoteze (dN>dS, pozitivna selekcija) za sva tri lokusa je statistički značajna (P<0,05) što ukazuje na djelovanje pozitivne selekcije na lokusima (Tablica 13.).

Tablica 13. Sinonimne (dS) i nesinonimne (dN) udaljenosti među alelima triju istraženih lokusa, njihovi omjeri (dN/dS) i P vrijednosti testiranja neutralne evolucije (nulta hipoteza) u korist pozitivne selekcije (alternativna hipoteza).

Lokus	N	dN	dS	dN/dS	P
DRB1	4	0,076 (0,018)	0,037 (0,018)	2,05	0,021
DQA1	2	0,027 (0,016)	0,000 (0,000)	∞	0,046
DQB1	3	0,091 (0,025)	0,039 (0,019)	2,33	0,025

4.5.2. Analiza programa OmegaMap

Programom OmegaMap utvrđeni su kodoni pod utjecajem pozitivne selekcije na svakom od lokusa. Na lokusima *DRB1* i *DQB1* dobiveni su slični rezultati, odnosno 10 kodona pod utjecajem pozitivne selekcije na DRB1 lokusu i 9 kodona na *DQB1* lokusu. Samo dva kodona pod utjecajem pozitvne selekcije pronađeno je na *DQA1* lokusu. Rezultati analize programa OmegaMap prikazani su u Tablici 14.

Tablica 14. Kodoni pod utjecajem pozitivne selekcije utvrđeni programom OmegaMap.

Lokus	Broj kodona pod pozitivnom selekcijom	Kodoni pod utjecajem pozitivne selekcije
DRB1	10	6, 8, 23, 25, 27, 32, 58, 66, 73, 81
DQA1	2	29, 64
DQB1	9	8, 25, 52, 58, 62, 66, 80, 84,85

4.6. Usporedba alelnog bogatstva programom FSTAT

Usporedila sam broj pronađenih alela kod populacije čaglja iz ovog istraživanja sa onima pronađenih kod populacije vukova iz Hrvatske (Arbanasić i sur., 2013.) određivanjem alelnog bogatstva programom FSTAT. Populacija vukova sastojala se od 77 jedinki, a pronađeno je 13 alela na *DRB1* lokusu, 7 alela na *DQA1* lokusu i 11 alela na *DQB1* lokusu. Vrijednosti alelnog bogatstva tri su puta manja u čaglja nego u vuka, što ukazuje na smanjenu varijabilnost čaglja u usporedbi s vukom. Rezultati analize programa FSTAT navedeni su u Tablici 15.

Tablica 15. Usporedba alelnog bogatstva čaglja iz ovog istraživanja i vukova iz Hrvatske (Arbanasić i sur., 2013.).

Lokus	Alelno bogatstvo	
	Čagalj	Vuk
DRB1	4	12,262
DQA1	2	6,754
DQB1	3	10,466

4.7. Filogenetska analiza

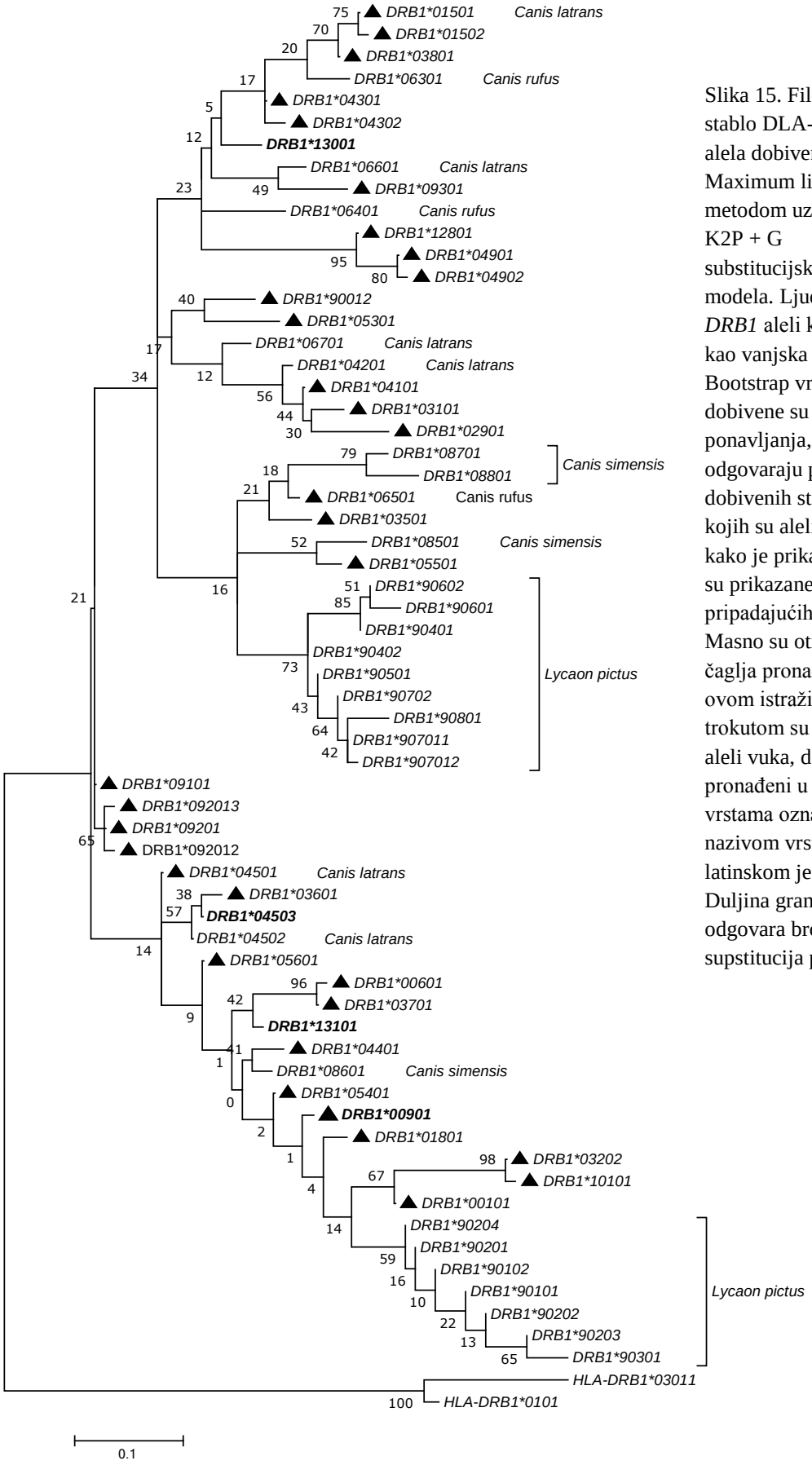
Filogenetsku analizu *DRB, DQA* i *DQB* alela napravila sam u programu MEGA metodom *Maximum likelihood* uz primjenu odgovarajućeg modela nukleotidne supstitucije odabranog prema Bayesovom informacijskom kriteriju. Za izradu filogenetskog stabla pojedinog lokusa koristila sam alele utvrđene ovim istraživanjem, te alele koji su ranije utvrđeni u porodici Canidae. Kao vanjsku skupinu kod izrade filogenetskih stabala koristila sam odgovarajuće ljudske MHC alele.

4.7.1. Filogenetsko stablo *DRB* alela

Filogenetsko stablo za *DRB* alele prikazano je na Slici 15. Za izradu filogenetskog stabla u obzir sam uzela ukupno 64 alela koji uključuju alele utvrđene kod divljih vrsta roda *Canis* (vuk, etiopski vuk, crveni vuk i kojot), alele afričkog divljeg psa (*Lycaon pictus*) i alele čaglja

utvrđene ovim istraživanjem. Aleli pronađeni kod čaglja masno su otisnuti, aleli vuka označeni su trokutom, dok je uz alele ostalih vrsta navedeno ime vrste na latinskom jeziku. Duljine grana proporcionalne su broju supstitucija po nukleotidnom mjestu.

Rezultati filogenetske analize uukazuju na postojanje transspecijskog polimorfizma koji je prisutan među blisko srodnim vrstama. Od ukupno 64 alela koja tvore filogenetsko stablo četiri alela zajednička su različitim vrstama. Analiza filogenetskog stabla *DRB* alela pokazuje da je većina grananja podržana niskim bootstrap vrijednostima. Dobro je podržano grananje koje odvaja alele porodice pasa od ljudskih alela. Aleli koji pripadaju pojedinim vrstama nisu grupirani, već isprepleteni. U skladu s tim, aleli čaglja utvrđeni u ovom istraživanju raspoređeni su duž stabla što ukazuje na njihovu međusobnu raznolikost. Iznimku čine aleli afričkog divljeg psa koji su izdvojeni u dvije odvojene skupine i smatra se da su karakteristični za vrstu. Pojedini aleli zabilježeni su u više od jedne vrste. Aleli *DRB1*01501* i *DRB1*04501* zabilježeni su kod vuka i kojota. Alel *DRB1*06501* zabilježen je kod vuka i crvenog vuka. Alel *DRB1*00901*, utvrđen u populaciji čaglja u ovom istraživanju također je prisutan i kod vuka.

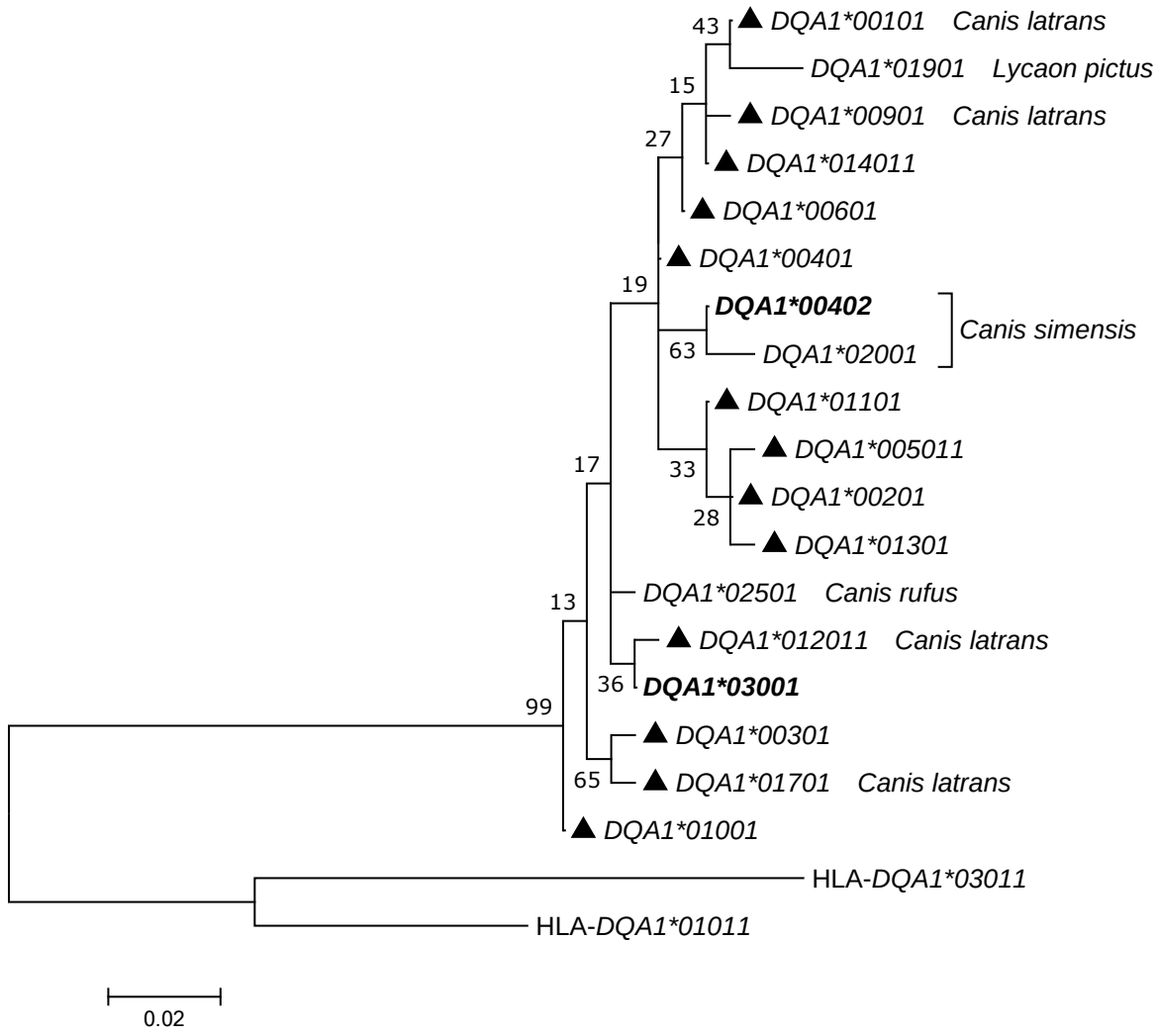


Slika 15. Filogenetsko stablo DLA-*DRB1* alela dobiveno Maximum likelihood metodom uz primjenu K2P + G substitucijskog modela. Ljudski HLA-*DRB1* aleli korišteni su kao vanjska skupina. Bootstrap vrijednosti dobivene su sa 1000 ponavljanja, odgovaraju postotku dobivenih stabala kod kojih su aleli grupirani kako je prikazano, te su prikazane pokraj pripadajućih čvorova. Masno su otisnuti aleli čaglja pronađeni u ovom istraživanju, trokutom su označeni aleli vuka, dok su aleli pronađeni u drugim vrstama označeni nazivom vrste na latinskom jeziku. Duljina grana odgovara broju supstitucija po mjestu.

4.7.2. Filogenetsko stablo *DQA* alela

Filogenetsko stablo za *DQA* alele prikazano je na Slici 16. Za izradu filogenetskog stabla u obzir sam uzela ukupno 18 alela koji uključuju alele utvrđene kod divljih vrsta roda *Canis* (vuk, etiopski vuk, crveni vuk i kojot), alele afričkog divljeg psa i alele čaglja utvrđene ovim istraživanjem. Aleli pronađeni kod čaglja masno su otisnuti, aleli vuka označeni su trokutom, dok je uz alele ostalih vrsta navedeno ime vrste na latinskom jeziku. Duljine grana proporcionalne su broju supstitucija po nukleotidnom mjestu.

Analiza filogenetskog stabla *DQA* alela ukazuje na prisutnost transspecijskog polimorfizma. Od ukupno 18 alela koji su korišteni za izradu filogenetskog stabla šest ih je prisutno u dvije različite vrste. Analizom filogenetskog stabla *DQA* alela vidljivo je da je većina grana podržana niskim bootstrap vrijednostima. Dobro je podržana grana koja odvaja alele porodice pasa od ljudskih alela. Aleli koji pripadaju pojedinim vrstama nisu grupirani, već isprepleteni. Aleli čaglja utvrđeni u ovom istraživanju raspoređeni su duž stabla, što ukazuje na njihovu raznolikost. Pojedini aleli prisutni su u više od jedne vrste, što ukazuje na transspecijski polimorfizam. Vuk i kojot dijele alele *DQA1*00101*, *DQA1*00901*, *DQA1*012011* i *DQA1*01701*. *Alel DQA1*00402* utvrđen u populaciji čaglja u ovom istraživanju pronađen je i kod etipskog vuka.

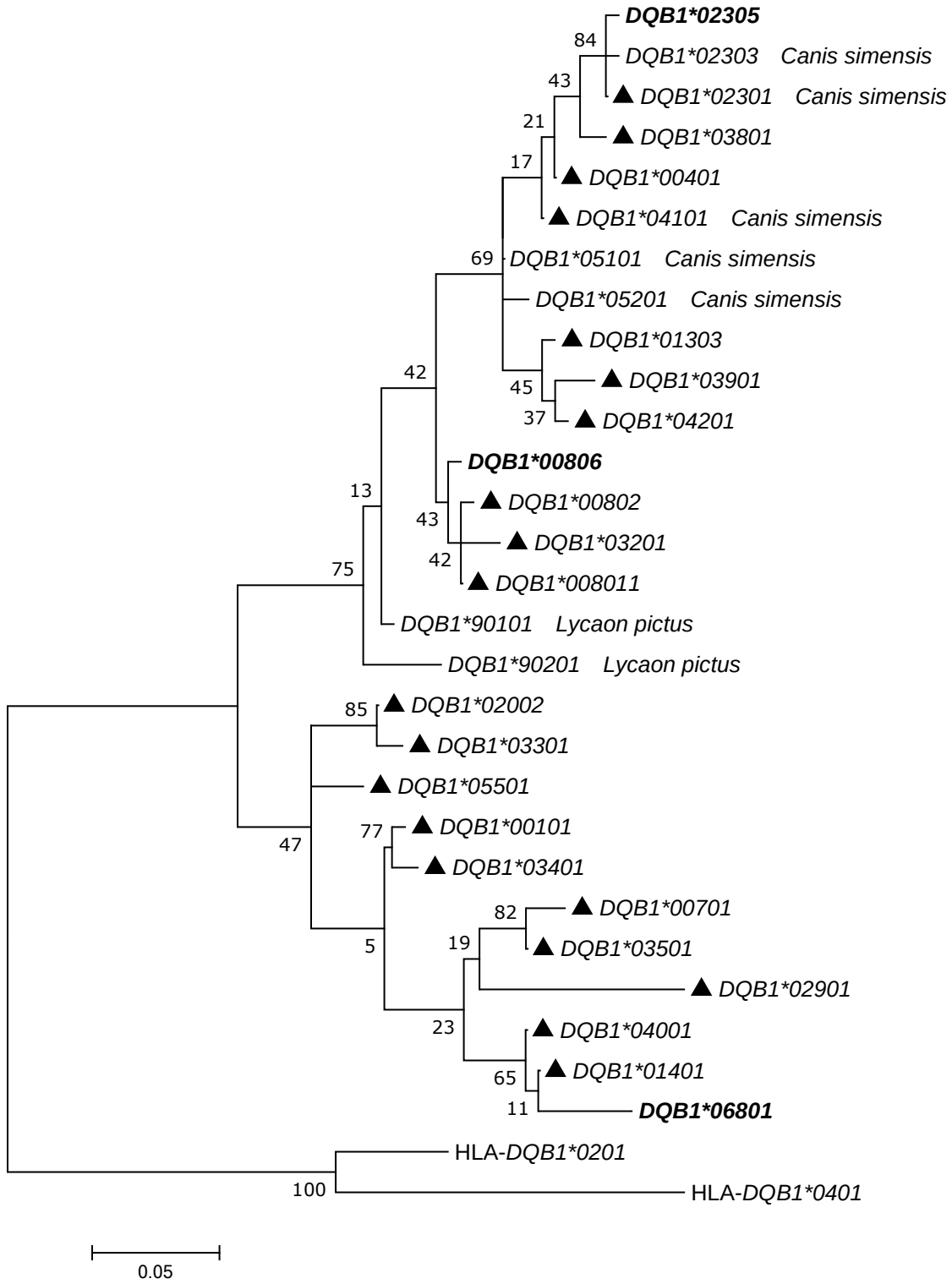


Slika 16. Filogenetsko stablo DLA-*DQA1* alela dobiveno Maximum likelihood metodom uz primjenu K2P + G substitucijskog modela. Ljudski HLA-*DQA1* aleli korišteni su kao vanjska skupina. *Bootstrap* vrijednosti dobivene su sa 1000 ponavljanja, a odgovaraju postotku dobivenih stabala kod kojih su aleli grupirani kako je prikazano. Pokraj pripadajućih čvorova prikazane su *Bootstrap* vrijednosti. Masno su otisnuti aleli čaglja pronađeni u ovom istraživanju, trokutom su označeni aleli vuka, dok su aleli pronađeni u drugim vrstama označeni nazivom vrste na latinskom jeziku. Duljina grana odgovara broju supstitucija po mjestu.

4.7.3. Filogenetsko stablo *DQB* alela

Filogenetsko stablo za *DQB* alele prikazano je na Slici 17. Za izradu filogenetskog stabla u obzir sam uzela ukupno 28 alela koji uključuju alele utvrđene kod divljih vrsta roda *Canis* (vuk, etiopski vuk, crveni vuk i kojot), alele afričkog divljeg psa (*Lycaon pictus*) i alele čaglja utvrđene ovim istraživanjem. Aleli pronađeni kod čaglja masno su otisnuti, aleli vuka označeni su trokutom, dok je uz alele ostalih vrsta navedeno ime vrste na latinskom jeziku. Duljine grana proporcionalne su broju supstitucija po nukleotidnom mjestu.

Kao i kod filogenetskih stabla *DRB* i *DQA* alela utvrđeno je postojanje transspecijskog polimorfizma kod *DQB* alela. Od ukupno 28 alela korištenih za izradu filogenetskog stabla *DQB* alela dva alela pronađena su kod dviju vrsta. Analizom filogenetskog stabla *DQB* alela vidljivo je da je većina grana podržana niskim bootstrap vrijednostima. Dobro je podržana grana koja odvaja alele porodice pasa od ljudskih alela. Aleli koji pripadaju pojedinim vrstama nisu grupirani, već isprepleteni, što ukazuje na njihovu raznolikost. Tako su aleli čaglja utvrđeni u ovom istraživanju raspoređeni duž stabla i nisu pronađeni kod drugih vrsta.



Slika 17. Filogenetsko stablo DLA-*DQB1* alela dobiveno Maximum likelihood metodom uz primjenu JC + G substitucijskog modela. Ljudski HLA-*DQB1* aleli korišteni su kao vanjska skupina. *Bootstrap* vrijednosti dobivene su sa 1000 ponavljanja, a odgovaraju postotku dobivenih stabala kod kojih su aleli grupirani kako je prikazano. Pokraj pripadajućih čvorova prikazane su *Bootstrap* vrijednosti. Masno su otisnuti aleli čaglja pronađeni u ovom istraživanju, trokutom su označeni aleli vuka, dok su aleli pronađeni u drugim vrstama označeni nazivom vrste na latinskom jeziku. Duljina grana odgovara broju supstitucija po mjestu.

4.8. Rekombinacije

Programom RDP4 tražila sam dokaz o postojanju intralokusnih rekombinacija među alelima *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusa pronađenima u populaciji čaglja iz ovog istraživanja. Niti na jednom od tri lokusa nisam pronašla dokaz za postojanje rekombinacija.

5. RASPRAVA

Ovo je prvo istraživanje MHC genske regije u čaglja u Hrvatskoj. Predmet ovog istraživanja su *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* lokusi MHC regije skupine II u čaglja u Hrvatskoj i Srbiji. Podaci o MHC alelima u populaciji čaglja predstavljaju važan podatak o stanju, zdravlju i otpornosti čaglja na patogene. Pronađeno je ukupno 9 alela na sva 3 lokusa, od kojih je 7 novootkriveno i osam novootkrivenih haplotipova. Učinjena je usporedba genetičke konstitucije MHC regije skupine II čaglja iz Dalmacije, Slavonije i Srbije, dok su računalnim programima analizirani pokazatelji molekularne evolucije na utvrđenim alelima.

Na *DRB1* lokusu pronašla sam ukupno 4 alela, od kojih su tri novootkrivena na čaglju. Alel *DRB1*00901* otkriven je ranije na vuku iz Sjeverne Amerike (Kennedy i sur., 2007.a) i kod 25 različitih pasmina pasa (Kennedy i sur., 2007.b). Broj polimorfnih mjesta među *DRB* alelima prisutnim u istraženom uzorku je 30, što čini prosječno svako treće nukleotidno mjesto polimorfnim, od kojih prevladavaju nesinonimne mutacije, njih 19.

Na *DQA1* lokusu pronašla sam samo dva alela, što čini najmanji broj alela pronađenih na nekom lokusu, od kojih je alel *DQA1*03001* novootkriven. Alel *DQA1*00402* otkriven je ranije na etiopskom vuku (Kennedy i sur., 2011.) i kod nekoliko pasmina pasa (Kennedy i sur., 2007.b). Do sad je kod pripadnika roda *Canis* na tom lokusu pronađen 31 alel. Broj polimorfnih nukleotidnih mjesta među *DQA* alelima istraženog uzorka je 5, od kojih 3 rezultira promjenom aminokiseline.

Na *DQB1* lokusu pronašla sam tri alela, a svi su novootkriveni na čaglju. Broj polimorfnih nukleotidnih mjesta među *DQB* alelima istraženog uzorka je 29, od kojih je 16 nesinonimnih i rezultiraju promjenom aminokiseline.

Uočila sam da translacijom svakog alela na svim istraženim lokusima nastaju potpuno različiti aminokiselinski sljedovi koji čine jedinstveni proteinski produkt. Smatram da navedena pojava ukazuje na funkcionalnu važnost polimorfizma među alelima.

Postojanje istog alela u različitih, ali bliskih vrsta, kao što je slučaj sa *DRB1*00901* i *DQA1*00402*, dokaz je transspecijskog polimorfizma (engl. *transspecies polymorphism*), što znači da je alel stariji od vrste (Garrigan i Hedrick, 2003.). Djelovanjem ravnotežne selekcije alel se zadržava tijekom specijacijskog događaja (Sommer, 2005.). Iz toga proizlazi da su aleli srodnih vrsta međusobno sličniji nego aleli pojedine vrste (Bernatchez i Landry, 2003.). Postojanje transspecijskog polimorfizma smatra se dokazom djelovanja ravnotežne selekcije, a zabilježen je kod mnogih vrsta. Transspecijski polimorfizam gena MHC II zabilježen je kod

čovjeka i čimpanze, te kod vrsta iz reda parnoprstaša kod kojih se pretpostavlja djelovanje ravnotežne selekcije kroz razdoblje od 20 milijuna godina (Garrigan i Hedrick, 2003.). Transspecijski polimorfizam vidljiv je iz filogenetskog stabla MHC alela. Aleli nisu grupirani prema vrstama kojima pripadaju, a unutar istih skupina nalaze se aleli različitih vrsta. Iz filogenetskih stabala sva tri lokusa vidljivo je da grananja nisu statistički podržana. Filogenetska stabla MHC alela ne prikazuju filogeniju vrsta, već srodnost među alelima.

U istraženoj populaciji čaglja utvrđeno je ukupno osam trolokusnih *DRB1/DQA1/DQB1* haplotipova, od čega su svi novootkriveni na čaglju. Šest haplotipa se javlja u više od jedne jedinke. Četiri haplotipa su pronađena u homozigotnom obliku, a sastavljeni su od alela koji se u populaciji pojavljuju s najvećom učestalošću na sva tri lokusa. Dva haplotipa pronađena su u samo jednoj jedinci. Broj od 8 pronađenih haplotipova (Tablica 9.) relativno je malen kada se uzme u obzir da je kombinacijom 4 *DRB,* 2 *DQA* i 3 *DQB* alela moguće dobiti 24 različita haplotipa. Navedena pojava posljedica je neuravnoteženog vezivanja (engl. *linkage disequilibrium*) kod kojega se prednost daje određenim alelnim kombinacijama, koje su se pokazale uspješnima u borbi protiv patogena. Neuravnoteženo vezivanje tipično je za MHC gensku regiju i smatra se posljedicom i dokazom ravnotežne selekcije, te je zabilježeno u mnogim istraživanjima (Hedrick i sur. 1991.; Huttley i sur. 1999.). Neuravnoteženo vezivanje (engl. *linkage disequilibrium*) alela različitih lokusa znači da se učestalo nasljeđuju ustaljene kombinacije alela koji pripadaju različitim lokusima što je posljedica djelovanja selekcije koja se odvija tijekom više desetaka ili stotina generacija (Hedrick, 2000.). U skladu s tim su i rezultati dobiveni u ovom istraživanju. Smatra se da određeni haplotipovi nose selektivnu prednost u otpornosti na patogene tipične za populaciju ili vrstu (Klitz i Thomson, 1987.).

Usporedila sam rezultate dobivene kod čaglja s različitih područja, odnosno iz Dalmacije, Slavonije i Srbije. Kod čaglja iz Dalmacije pronašla sam sva 4 *DRB* alela, 2 *DQA* alela i 3 *DQB* alela. Od ukupno devet pronađenih alela na sva tri lokusa, uočila sam da su dva alela, *DRB1*04503* i *DQB1*00806,* pronađena isključivo na čaglju iz Dalmacije. Kod čaglja iz Slavonije pronašla sam 3 *DRB* alela, 2 *DQA* alela i 2 *DRB* alela. Kod čaglja iz Srbije pronašla sam 3 *DRB* alela, 2 *DQA* alela i 2 *DQB* alela.

Također, od osam utvrđenih haplotipa, 7 ih je utvrđeno na čaglju iz Dalmacije, te po 4 na čaglju iz Slavonije i Srbije (Tablica 10.). Tri haplotipa tipična su za čaglja iz Dalmacije i jedan za čaglja iz Srbije. Među haplotipovima *DRB1*04503/DQA1*00402/DQB1*02305, DRB1*13001/DQA1*00402/DQB1*00806, DRB1*13001/DQA1*03001/DQB1*06801* koji su

pronađeni isključivo na čaglju iz Dalmacije, dva sadrže alele tipične za tu regiju, dok preostali haplotip predstavlja novootkrivenu kombinaciju alela. Svi haplotipovi pronađeni na čaglju iz Slavonije prisutni su i kod čaglja iz Dalmacije, a samo jedan od njih nije pronađen na čaglju iz Srbije. Haplotip *DRB1*00901/DQA1*03001/DQB1*06801*, tipičan za jedinke iz Srbije sadrži alele postojeće u populaciji čaglja iz Hrvatske, međutim dosad neotkrivenim u toj kombinaciji. Različita geografska raspodjela haplotipova može ukazivati na različite ekološke uvjete kao što su klima, sastav plijena te patogeni koji su utjecali na genetičku strukturu MHC regije čaglja kao rezultat prilagodbe. Rezultati ukazuju na veću genetičku raznolikost čaglja iz Dalmacije. Na 19 jedinki čaglja iz Dalmacije pronađeno je 7 različitih haplotipova, dok je na 35 čaglja iz Slavonije pronađeno samo 4 haplotipa. Na 7 jedinki čaglja iz Srbije pronađena su također 4 različita haplotipa. Čagalj iz Srbije dijeli s čagljem iz Slavonije čak 75 % haplotipova, dok sa čagljem iz Dalmacije dijele 43 % haplotipova, što ukazuje na zajedničko podrijetlo čaglja iz Slavonije i Srbije. Dok je čagalj prisutan u Dalmaciji od 15. stoljeća kamo je stigao Jadranskom rutom, čagalj je u Slavoniju stigao tek početkom 20. stoljeća s područja Bugarske, Srbije i Rumunjske (Gianatos, 2004.). Rezultati su u skladu s istraživanjima na neutralnim lokusima (Fabbri i sur. 2014.) koji su pokazali da se populacija čaglja iz Dalmacije genetički razlikuje od populacija čaglja s drugih dijelova Balkanskog područja kojemu pripada i Slavonija. Uočeni rezultati vjerojatno su posljedica prilagodbe čaglja na lokalne životne uvjete pojedinog geografskog područja, u ovom slučaju Dalmacije i Slavonije. Navedena pojava tzv. diverzificirajuće selekcije u kojoj različiti selektivni pritisci, osobito patogeni, potiču lokalnu adaptaciju i održavaju raznolikost MHC alela među odvojenim geografskim područjima. Slični rezultati već su zabilježeni kod nekoliko vrsta divljih životinja. Kod dvije europske geografski razdvojene populacije divlje šljuke uočena je genetička diferencijacija gena B MHC skupine II (Ekblom i sur. 2007.). Istraživanje na međusobno izoliranim populacijama sivog tuljana sa područja Ujedinjenog Kraljevstva i Kanade pokazalo je da *DQB* geni MHC skupine II pokazuju veću diferencijaciju među različitim kolonijama u usporedbi s neutralnim mikrosatelitskim markerima. Kolonije sa sličnih staništa imale su slične frekvencije *DQB* alela nego populacije sa različitih staništa. Budući da ista pojava nije uočena na mikrosatelitskim markerima zaključeno je da na gene MHC skupine II utječe selekcija posredovana tipičnim patogenima pojedinog staništa (Cammen i sur., 2011.).

Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže i višak heterozigota smatraju se pokazateljima djelovanja selekcije. Uočena heterozigotnost manja je od očekivane heterozigotnosti za sve alele i haplotipove, pri čemu statistički značajan otklon nije pronađen (Tablica 11). Značajno

odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u smislu veće heterozigotnosti dokazalo bi postojanje pozitivne selekcije na razini populacije. Međutim, u većini istraživanja na životinjskim populacijama nije zamijećen otklon od Hardy-Weinbergove ravnoteže iz razloga što selekcija nije dovoljno jaka sila koja bi bila zamijećena unutar jedne generacije ili jednostavno nije izražena u svim generacijama i na svim prostorima (Garrigan i Hedrick, 2003.). Mogući razlog izostanka odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže mogao bi biti nereprezentativan ili premalen uzorak, budući da je otklon uočljiv na uzorcima od 100 ili više jedinki (Apanius i sur. 1997.). Također je moguće da se djelovanje pozitivne selekcije ne očituje u obliku povećane heterozigotnosti unutar populacije (Piertney i Oliver, 2006.).

Analiza alelnog bogatstva pokazala je da je kod čaglja pronađeno 4 *DRB* alela, 2 *DQA* alela i 3 *DRB* alela, dok je u usporedbi s čagljem alelno bogatstvo vukova 12,6 *DRB* alela, 6,8 *DQA* alela i 10,5 *DQB* alela. Rezultati alelnog bogatstva ukazuju na smanjenu genetičku raznolikost čaglja iz Hrvatske u odnosu na onu u vuka. Rezultati slični našima pronađeni su kod ugroženog etiopskog vuka (*Canis simensis*) kod kojeg su utvrđena 4 *DRB,* 2 *DQA* i 5 *DQB* alela na 99 jedinki (Kennedy i sur., 2011.). Mali broj utvrđenih alela u ovom istraživanju u skladu je s rezultatima dobivenim na neutralnim lokusima čaglja iz Srbije koje je pokazalo vrlu malu genetičku varijabilnost (Zachos i sur., 2009), te rezultatima od Fabbri i sur. (2014.). U suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja, na 13/9/11 jedinki čaglja iz Izraela/istočne Afrike/južne Afrike utvrđeno je 6 *DRB*, 5 *DQA* i 6 *DQB* alela (Marsden i sur., 2010.). Iako je uočena smanjena genetička raznolikost čaglja u ovom istraživanju u vidu malog broja utvrđenih alela, utvrđene evolucijske udaljenosti među alelima su značajne i doprinose održavanju funkcionalne raznolikosti MHC II alela. To znači da unatoč malom broju alela, receptori MHC skupine II mogu prikazati širok spektar antigena. Navedena pojava rezultat je pozitivne selekcije kojom su u populaciji opstali oni haplotipovi koji nose visoko raznolike alele. Slična pojava uočena je na euroazijskim dabrovima (Babik i sur., 2005.) i europskom bizonu (Radwan i sur., 2007), kod kojih je utvrđen malen broj vrlo raznolikih alela.

Vrijednosti evolucijskih udaljenosti utvrđene među pronađenim alelima u korelaciji su sa vrijednostima ostalih pokazatelja polimorfizma za istražene lokuse - brojem polimorfnih mjesta i brojem prijavljenih alela. Tako je najmanja nukleotidna evolucijska udaljenost nađena među *DQA* alelima (2,1 %), veća među *DQB* alelima (7,8 %), a najveća među *DRB* alelima (30.3%) (Tablica 12.).

Za sva tri lokusa su vrijednosti dobivene za aminokiselinske znatno više od vrijednosti dobivenih za nukleotidne udaljenosti. To je posljedica postojanja većeg broja nesinonimnih supstitucija od sinonimnih i ukazuje na selektivno održavanje nesinonimnih supstitucija na lokusima kroz dulji evolucijski period (Leutkemeier i sur. 2009).

Za MHC gene karakteristično je da su pod utjecajem ravnotežne selekcije koja djeluje tako da u populaciji ili vrsti održava više funkcionalnih alela koji pripadaju istom lokusu, a uz to aleli opstaju tokom dugog evolucijskog razdoblja (Hughes i Nei 1988; Richman, 2000).

Primjena dN/dS testa je kod velikog broja vrsta potvrdila djelovanje ravnotežne selekcije na MHC lokusima (Bryja i sur. 2006.; Babik i sur. 2008.; Oliver i Piertney 2006.; Musolf i sur. 2004.; Barbisan i sur, 2009.; Kennedy i sur. 2007.a; Radwan i sur. 2007.; Schaschl i sur. 2006.; Surridge i sur. 2008.; Babik i sur. 2005.; Leutkemeier i sur. 2009.). U uzorku čaglja analizirala sam omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija za sva tri istražena lokusa programom MEGA 5.01 koji u obzir uzima nukleotidnu sekvencu kao cjelinu. Omjer dN/dS veći je od 1 za sva tri lokusa (Tablica 13.), što znači da je na svim lokusima prisutno više nesinonimnih od sinonimnih mutacija. Štoviše, višak nesinonimnih mutacija je statistički značajan, što je potvrda djelovanja ravnotežne selekcije na lokusima. Nedostatak dN/dS testa koji analizira ukupne nukleotidne sljedove je u tom sto je varijabilnost aminokiselinska, pa tako i nukleotidna, prisutna samo na određenim mjestima u sekvenci. Ta mjesta kod MHC lokusa su ona za koja se pretpostavlja da sudjeluju u vezanju antigena. Za razliku od polimorfnih mjesta, u nukleotidnim i aminokiselinskim sljedovima postoje i konzervirana mjesta. Ona mogu biti nepromijenjiva ili slična među vrstama i genomima. Njihova je uloga formiranje vodikovih veza sa N- i C-krajevima na okosnici stranog peptida s receptorom. Ta je interakcija receptor-peptid neovisna o genu ili alelu (Bondinas i sur., 2007.). Nadalje, nakupljene sinonimne mutacije koje su se akumulirale tijekom dugog evolucijskog razdoblja utječu na ishod testa smanjujući dN/dS omjer. Zbog toga se često u analizama izdvajaju pretpostavljena vezna mjesta, pa se dN/dS test primjenjuje odvojeno na veznim i neveznim dijelovima sljedova. Vezna mjesta redovito su odabrana prema pretpostavljenoj analogiji sa ljudskim α i β lancima (Brown i sur, 1993.). Ovakav pristup pokazuje nekoliko mogućih nedostataka. Vezna mjesta nisu nužno ista među različitim vrstama. Položaj i struktura veznih mjesta mogu varirati čak među alelima istog lokusa (Fremont i sur. 1998; Latek i sur 2000; Scott i sur. 1998). Uz to, za neke vezne kodone je utvrđeno da su konzervirani unutar vrste, čak i među vrstama.

Na *DRB1* lokusu pronađeno je 11 kodona na koje djeluje pozitivna selekcija, na *DQA1* lokusu dva kodona i na *DQB1* lokusu 9 kodona.

Iako su rekombinacije među različitim MHC lokusima rijetke, što dovodi očuvanju haplotipova (Degli-Esposti i sur., 1992.), rekombinacije među alelima istog lokusa (intralokusne rekombinacije) prilično su česte. Smatra se da rekombinacije imaju važnu ulogu u stvaranju raznolikosti među MHC alelima koja se zatim održava selekcijom (Satta 1997.). Rekombinacije nasuprot točkastih mutacija obuhvaćaju više nukleotidnih supstitucija odjednom, čime se ubrzavaju genetičke promjene. To stvara mogućnost brže prilagodbe na promjene u okolišu, pa se smatra da aleli stvoreni rekombinacijom mogu imati veću selektivnu prednost (She i sur. 1991; Andersson i Mikko, 1995.). U istraženom uzorku nisu pronađeni dokazi za intralokusne rekombinacije među alelima niti jednog od lokusa. Razlog tome mogu biti prekratki rekombinantni sljedovi ili preniska razina raznolikosti među sekvencama. Također postoji mogućnost da je broj alela obuhvaćen analizom premalen da bi se uočili rekombinacijski procesi, s obzirom na mali broj utvrđenih alela u ovom istraživanju. Smatra se da rekombinacije pod utjecajem ravnotežne selekcije imaju daleko veću ulogu u stvaranju raznolikosti MHC-a, nego što to imaju točkaste mutacije. To je i potvrđeno u istraživanju na glodavcima (Richman (2003.a,b) divokozama i kopitarima (Schaschl i sur., 2005.; Schaschl i sur., 2006.). Postoji mogućnost da su aleli čaglja pronađeni u ovom istraživanju nastali rekombinacijama, ali to nije moglo biti potvrđeno ako aleli „roditelji“ nisu bili prisutni u uzorku. Relevantni rezultati o postojanju rekombinacijskih događaja mogli bi se utvrditi uključivanjem svih alela pronađenim na divljim vrstama iz porodice Canidae, s obzirom na postojanje transspecijskog polimorfizma zbog kojega su pojedini aleli stariji od vrste.

Dokazom djelovanja ravnotežne selekcije smatra se i postojanje transspecijskog polimorfizma (engl. *transspecies polymorphism*) (Garrigan i Hedrick, 2003), odnosno postajanje istog alela kod bliskih vrsta (Klein, 1980.). Ravnotežna selekcija djeluje kroz dugo vremensko razdoblje tijekom kojeg održava pojedine alele u populaciji (Takahata i Nei, 1990). Tijekom postojanja nekog alela može doći do razdvajanja vrste na nove, a pritom svaka zadrži sačuvani alel te tako alel postaje stariji od vrste. Ova pojava zabilježena je u mnogim istraživanjima MHC gena.

Ovo je prvo istraživanje MHC genske regije čaglja iz Hrvatske i Srbije. Istraživanje daje uvid u genetički status europskog čaglja na imunološki važnim lokusima i predstavlja temelj za nastavak istraživanja na ostalim europskim populacijama. Osim što doprinosi poznavanju genetike porodice pasa daje i uvid u porijeklo pojedinih populacija čaglja kao i njegovo širenje

s obzirom na diverzificirajuću selekciju. Kako bi se stekla potpunija slika o porijeklu čaglja, osobito populacije iz Dalmacije, potrebno je proširiti istraživanje sa uzorcima čaglja iz ostalih balkanskih zemalja kao što su Albanija, Makedonija i Grčka. S obzirom na važnost pasa zbog suživota s čovjekom, oni su najistraživaniji među vrstama iz porodice Canidae. Kao posljedica širenja, čagalj je sve više prisutan u staništima koje oblikuje čovjek, zbog čega može stupiti u bliski kontakt s čovjekom i psom, pri čemu je moguća razmjena uzročnika različitih bolesti. Također, zabilježeni su križanci psa i čaglja (Galov i sur. 2015.). Iz svih navedenih razloga smatram da je poznavanje gena uključenih u funkcioniranje imunološkog sustava čaglja od velikog značaja.

6. ZAKLJUČCI

Pronađeno je ukupno sedam novih alela. Novi aleli translacijom daju nove aminokiselinske sljedove.

Nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti među alelima su relativno visoke, što pokazuje značajan stupanj različitosti među alelima.

Aminokiselinske evolucijske udaljenosti za svaki lokus više su od nukleotidnih, što je posljedica selektivnog zadržavanja nesinonimnih mutacija na lokusima i u skladu je s djelovanjem ravnotežne selekcije.

Broj utvrđenih alela, broj polimorfnih mjesta, vrijednosti za nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti najmanji su za *DQA1* lokus, za njim slijedi *DQB1* lokus, a navedeni parametri najveći su za *DRB1* lokus.

Među alelima svih triju istraženih lokusa utvrđen je značajan višak nesinonimnih mutacija u odnosu na sinonimne što ukazuje na djelovanje pozitivne selekcije na lokusima tijekom evolucije vrste.

U populaciji je utvrđeno osam haplotipova, od kojih je šest prisutno u više od jedne jedinke. To je u skladu s pojavom neuravnoteženog vezivanja koje je karakteristično za MHC regiju i smatra se posljedicom djelovanja ravnotežne selekcije tijekom povijesti populacije.

Na lokusima *DRB1*, *DQA1* i *DQB1* u populaciji čaglja iz Hrvatske pronađen je razmjerno malen broj alela u odnosu na populacije vukova iz Hrvatske što ukazuje na smanjenu genetičku raznolikost čaglja.

Populacija čaglja iz Dalmacije pokazuje veću raznolikost MHC lokusa skupine II od populacije čaglja iz Slavonije što ukazuje na diverzificirajuću selekciju.

Prema vrsti alela koji su pronađeni u istraženom uzorku, populacija čaglja iz Slavonije sličnija je populaciji čaglja iz Srbije što ukazuje na njihovo zajedničko podrijetlo.

Na sva tri istražena lokusa utvrđeno je postojanje kodona na koje djeluje pozitivna selekcija. Razlika u broju utvrđenih kodona na pojedinim lokusima u skladu je sa ostalim pokazateljima polimorfizma za svaki lokus.

Postojanje transspecijskog polimorfizma utvrđeno je na svakom od tri istražena lokusa i predstavlja dokaz o djelovanju ravnotežne selekcije na lokusima tijekom evolucije.

7. CITIRANA LITERATURA

Aguilar A, Roemer G, Debenham S, Binns M, Garcelon D, Wayne RK (2004) High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. Proceedings of the National Academy of Sciences 101, 3490–3494.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) The adaptive immune system. U: The molecular biology of the cell, 4th edn. Garland Science, New York, 1392–1420.

Andersson L, Mikko S (1995) Generation of MHC class II diversity by intra- and intergenic recombination. Immunological Review 143: 5–12.

Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D (2010) Imunologija, sedmo, obnovljeno i dopunjeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb

Arbanasić H, Galov A, Ambriović-Ristov A, Grizelj J, Arsenos G, Marković B, Dovenski T, Vince S, Čuri I (2013) Extensive polymorphism of the major histocompatibility complex DRA gene in Balkan donkeys: perspecitves on selection and genealogy. Animal Genetics 44: 711-716.

Arnold J, Humer A, Heltai M, Murariu D, Spassov N, Hacklander K (2012) Current status and distribution of golden jackals *Canis aureus* in Europe. Mammal Review 42: 1-11.

Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK (1997) The nature of selection on the major histocompatibility complex. Critical Reviews in Immunology 17: 179–224.

Babik W, Durka W, Radwan J (2005) Sequence diversity of the MHC *DRB* gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). Molecular Ecology 14: 4249-4257.

Babik W, Pabijan M, Radwan J (2008) Constricting patterns of variation in MHC loci in the Alpine newt. Molecular Ecology 17: 2339-2355.

Barbisan F, Savio C, Bertorelle G, Patarnello T, Congiu L (2009) Duplication polymorphism at MHC class II locus in the wild boar (*Sus scrofa*). Immunogenetics 61: 145-151.

Bernatchez L, Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? Journal of Evolutionary Biology 16: 363-377.

Bertorelle G, Excoffier L (1998) Inferring admixture proportions from molecular data. Molecular Biology and Evolution 15: 1298–1311.

Bondinas G, Moustakas A, Papadopoulos G (2007) The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. Immunogenetics 59: 539–553.

Boni MF, Posada D, Feldman MW (2007) An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. Genetics 176: 1035-1047.

Bošković I (2013) Zvijer koja osvaja Hrvatsku, Lovački vjesnik 1-2: 28-31.

Bošković I, Florijančić T, Ozimec S, Degmečić, D (2015) Stručna podloga za utvrđivanje osnovnih odrednica obitavanja, statusa i smjernica gospodarenja čagljem (*Canis aureus L.*) u Republici Hrvatskoj. Osijek: Poljoprivredni fakultet.

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley CD (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibilitiy antigen HLA-DR1. Nature 364: 33-39.

Bryja J, Galan M, Charbonnel N, Cosson JF (2006) Duplication, balancing selection and trans-species evolution explain the high levels of polymorphism of the *DQA* MHC class II gene in voles (Arvicolinae). Immunogenetics 58: 191-202.

Cammen K, Hoffman JI, Knapp LA, Harwood J, Amos W, (2011) Geographicvariation of the major histocompatibility complex in Eastern Atlantic greyseals (*Halichoerus grypus*). Molecular Ecology 20: 740–752.

Clarke B, Kirby DR (1966) Maintenance of histocompatibility polymorphisms. Nature 211: 999-1000.

Cohen MT, King R, Dolev A, Boldo A, Lichter-Peled A, Bar-Gal KG (2013) Genetic characterization of populations of the golden jackal and the red fox in Israel. Conservation Genetics, Springer, Doordtrecht, Netherlands.

Ćirović D, Chochlakis D, Tomanović S, Sukara R, Penezić A, Tselentis Y, Psaroulaki A (2014) Presence of *Leishmania* and *Brucella* species in the golden jackal *Canis aureus* in Serbia. BioMed Research International 3305.

Degli-Esposti MA, Leaver AL, Christiansen FT, Witt CS, Abraham LJ, Dawkins RL (1992) Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes. Human Immunology 34: 242-252.

Doherty PC, Zinkernagel RM (1975) Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. Nature 256: 50-52.

Ekblom R, Sæther SA, Jacobsson P, Fiske P, Sahlman T, Grahn M, Kålås JA, Höglund J (2007) Spatial pattern of MHC class II variation in the great snipe (*Gallinago media*). Molecular Ecology 16: 1439–1451.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.

Fabbri E, Caniglia R, Galov A, Arbanasić H, Lapini L, Boškovic I, Florijančić T, Vlasseva A, Ahmed A, Mirchev RL, Randi E (2014) Genetic structure and expansion of golden jackals (*Canis aureus*) in the north-western distribution range (Croatia and eastern Italian Alps). Conservation Genetics 15**:** 187-199.

Farkas R, Solymosi N, Takács N, Hornyák Á, Hornok S, Nachum-Biala Y, Baneth G (2014) First molecular evidence of Hepatozoon canis infection in red foxes and golden jackals from Hungary. Parasites & Vectors 7: 303.

Fremont DH, Monnaie D, Nelson CA, Hendrickson WA, Unanue ER (1998) Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme. Immunity 8: 305–317.

Galov A, Fabbri E, Caniglia R, Arbanasić H, Lapalombella S, Florijančić T, Bošković I, Galaverni M, Randi E (2015) First evidence of hybridization between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers. Royal Society Open Science 2: 150450.

Galaverni M, Caniglia R, Fabbri E, Lapalombella S, Randi, E (2013) MHC Variability in an Isolated Wolf Population in Italy. Journal of Heredity 104: 601-612.

Garrigan D, Hedrick PW (2003) Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. Evolution 57: 1707-1722.

Giannatos G (2004) Population status and Conservation Action Plan for the golden jackal (*Canis aureus*) in Greece; WWF Athens: 1-47.

Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2000) Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. Bioinformatics. 16: 573-582.

Goudet J (2002) FSTAT a Program to Estimate and Teste Gene Diversities and Fixation Indices, Available at http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

Hedrick PW, Lee RN, Garrigan D (2002) Major histocompatibility complex variation in red wolves: Evidence for common ancestry with coyotes and balancing selection. Molecular Ecology 11:1905–1913.

Hedrick PW (2002) Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. Evolution 56: 1902-1908.

Hedrick PW, Klitz W, Robinson WP, Kuhner M, Thomson G (1991) Evolutionary genetics of HLA. U: R. Selander, Clark AG, Whittam T (ed.) Evolution at the molecular level. Sinauer Assoc, Sunderland, MA, 248–271.

Hedrick WH, Lee RN, Parker KM (2000) Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. Heredity 85: 617-624.

Hill RE, Hastie ND (1987) Accelerated evolution in the reactive center regions of serine protease inhibitors. Nature 326: 96-99.

Hughes AL, Nei M (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. Nature 335: 167–170.

Hughes AL, Nei M (1989) Nucleotide substitution at major histocompatibility complex II loci: Evidence for overdominant selection. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 958–962.

Hughes AL, Nei M (1992) Maintenance of MHC polymorphism. Nature 355: 402-403.

Huttley GA, Smith MW, Carrington M, O'Brien SJ (1999) A scan for linkage disequilibrium across the human genome. Genetics 152: 1711–1722.

Ionică AM, Matei IA, D'Amico G, Daskalaki AA, Juránková J, Ionescu DT, Mihalca AD, Modrý D, Gherman CM (2016) Role of golden jackals (*Canis aureus*) as natural reservoirs of Dirofilaria spp. in Romania. Parasites & Vectors, 9: 240.

Jhala YV, Moehlman PD (2008) *Canis aureus*. U: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

Kennedy LJ, Angles JM, Barnes A, Carmichael LE, Radford AD, Ollier WER, Happ M (2007a) DLA-*DRBI*, *DQAI*, and *DQBI* alleles and haplotypes in North American Gray Wolves. Journal of Heredety 98(5): 491-499.

Kennedy LJ, Barnes A, Short A, Brown JJ, Lester S, Seddon J, Fleeman L, Francino O, Brkljacic M, Knyazev S, Happ GM, Ollier WER, (2007b) Canine DLA diversity: 1. New alleles and haplotypes. Tissue Antigens 69: 272–288.

Kennedy LJ, Quarmby S, Fretwell N et al. (2005) High-resolution characterisation of the canine DLA-*DRB1* locus using reference strand-mediated conformational analysis (RSCA). Journal of Heredity 96: 836–42.

Kennedy LJ, Altet L, Angles JM, Barnes A, Carter SD, Francino O, Gerlach, JA, Happ GM, Ollier WER, Polvi A, Thomson W, Wagner (1999) Nomenclature for factors of the Dog Major Histocompatibility System (DLA), 1998: First report of the ISAG DLA Nomenclature Committee Tissue Antigens 54: 312-21.

Kennedy LJ, Barnes A, Haap GM, Quinnell RJ, Bennett D, Angles JM, Day MJ, Carmichael N, Innes JF, Isherwood D, Carter SD, Thomson W, Ollier WER. (2002a) Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. Tissue Antigens 59: 194-204.

Kennedy LJ, Barnes A, Haap GM (2002b) Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations. Tissue Antigens 60: 43–52.

Kennedy LJ, Carter SD, Barnes A (1998) Nine new dog DLA-*DRB1* alleles identified by sequence based typing. Immunogenetics 48: 296-301.

Kennedy LJ, Carter SD, Barnes A (1999) Interbreed variation of DLA-*DRB1*, *DQA1* alleles and haplotypes in the dog. Veterinary Immunology and Immunopathology 69: 101–11.

Kennedy LJ, Hall LS, Carter SD (2000) Identification of further DLA-*DRB1* and *DQA1* alleles in the dog. European Journal of Immunogenetics 27: 25–28.

Kennedy LJ, Randall DA, Knobel D, Brown JJ, Fooks AR, Argaw K, Shiferaw F, Ollier WER, Sillero-Zubiri C, Macdonald DW, Laurenson MK (2011) Major histocompatibility complex diversity in the endangered Ethiopian wolf (*Canis simensis*). Tissue Antigens 77: 118-125 .

Kindt JT, Goldsby RA, Osborne BA (2007) Kuby Immunology. 6th edn. W.H.Freeman and Company, New York.

Klein J (1980) Generation of diversity at MHC loci: implications for T-cell repertoires. U: Fougereau M, Dausset J (ed.) Immunology 80. Academic press, London. 239-253.

Klitz W, Thomson G (1987) Disequilibrium pattern analysis. II. Application to Danish HLA A and B locus data. Genetics 116: 633–643.

Kryštufek B i Tvrtković N (1990) Range expansion by Dalmatian jackal population in the 20th century (*Canis aureus* Linnaeus, 1758). Folia Zoologica 39: 291-296.

Kryštufek B, Murariu D, Kurtonur C (1997) Present distribution of the golden jackal *Canis aureus* in the Balkans and adjacent regions. Mammal Review 24: 109–114.

Kumar S, Stecher G i Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.

Lanszki J, Giannatos G, Dolev A, Bino G, Heltai M (2010) Late autumn trophic flexibility of the golden jackal *Canis aureus.* Acta Theriologica 55(4): 361–370.

Latek RR, Suri A, Petzold SJ, Nelson CA, Kanagawa O, Unanue ER, Fremont DH (2000): Structural basis of peptide binding and presentation by the type I diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice. Immunity 12: 699–710.

Lemey P, Lott M, Martin DP, Moulton V (2009) Identifying recombinants in human and primate immunodeficiency virus sequence alignments using quartet scanning. BMC Bioinformatics 10: 126.

Leutkemeier ES, Malhi RS, Beever JE, Schook LB (2009) Diversification of porcine MHC class II genes: evidence for selective advantage. Immunogenetics 61: 119-129.

Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I (2006) Immunology. 7th edn. Elsevier

Marsden C, Mable B, Woodroffe R, Rasmussen G, Cleaveland S, McNutt J, Emmanuel M, Thomas R, Kennedy L (2009) Highly Endangered African Wild Dogs (*Lycaon pictus*) Lack Variation at the Major Histocompatibility Complex. Journal of Heredity 100: S54-S65.

Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. Virus Evolution 1: vev003

Maynard Smith J (1992) Analyzing the mosaic structure of genes. Journal of Molecular Evolution. 34: 126-129.

Mitková B, Hrazdilová K, D'Amico G, Duscher GG, Suchentrunk F, Forejtek P, Gherman CM, Matei IA, Ionică AM, Daskalaki AA, Mihalca AD, Votýpka J, Hulva P, Modrý D (2017) Eurasian golden jackal as host of canine vector-borne protists. Parasites & Vectors, 10: 183.

Mosaad YM (2015) Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease. Scandinavian Journal of Immunology 82: 283-306.

Murray B, Michaud R, White BN (1999) Allelic and haplotype variation of major histocompatibility complex class II *DRB1* and *DQB* loci in the St Lawrence beluga (*Delphinapterus leucas*). Molecular Ecology 8: 1127-1139.

Musolf K, Meyer-Lucht Y, Sommer S (2004) Evolution of MHC-*DRB* class II polymorphism in the genus Apodemus and a comparison of *DRB* sequence within the family Muridae (Mammalia: Rodentia). Immunogenetics 56: 420-426.

Nowak RM (1999) Walker's Mammals of the World. Johns Hopkins University Press, Baltimore

Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. Virology 265: 218-225.

Piertney SB, Oliver MK (2006) The evolutionary ecology of the major hitocompatibility complex. Heredity 96: 7-21.

Posada D, Crandall KA (2001) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. Proc. Natl Acad Sci USA. 98**:**13757-13762.

Potts WK, Wakeland EK (1990) Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. Trends in Ecology and Evolution 5: 181–186.

Radwan J, Kawalko A, Wojcik M, Babik W (2007) MHC-*DRB3* variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonanus*. Molecular Ecology 16: 531-540.

Richman A (2000) Evolution of balanced genetic polymorphism. Molecular Ecology 9: 1953-1963.

Richman AD, Herrera LG, Nash D (2003a) Evolution of MHC class II Eb diversity within the genus *Peromyscus*. Genetics 164: 197–289.

Richman A.D, Herrera LG, Nash D, Schierup HM (2003b) Relative roles of mutation and recombination in generating allelic polymorphism at an MHC class II locus in *Peromyscus maniculatus*. Genetics Research Cambridge 82: 89–99.

Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE (2015) The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. Nucleic Acids Research 43:D423-431

Rutkowski R, Krofel M, Giannatos G, Ćirović D, Mannil P, Volokh AM, Lanszki J, Heltai M, Szabo L, Banea OC, Yavruyan E, Hayrapetyan V, Kopaliani N, Miliou A, Tryfonopoulos GA, Lymberakis P, Penezić A, Pakeltytė G, Suchecka E, Bogdanowicz W (2015) A European Concern? Genetic Structure and Expansion of Golden Jackals (*Canis aureus*) in Europe and the Caucasus. PLoS ONE 10(11):e0141236.

Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE (1995) Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by BOOTSCANning. AIDS Res Hum Retroviruses 11: 1423-1425.

Satta Y (1997) Effects of intra-locus recombination on HLA polymorphism. Hereditas 127: 105–112.

Schaschl H, Suchentrunk F, Hammer S, Goodman SJ (2005) Recombination and the origin of sequence diversity in the *DRB* MHC class II locus in chamois (*Rupicapra spp*.). Immunogenetics 57: 108–115.

Schaschl H, Wandeler P, Suchentrunk F, Obexer-Ruff G, Goodman SJ (2006) Selection and recombination drive the evolution of MHC class II *DRB* diversity in ungulates. Heredity 97: 427-437.

Scott CA, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA (1998) Crystal structures of two I-Ad–peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues. Immunity 8: 319–329.

Seddon JM, Ellegren H (2002) MHC class II genes in European wolves: a comparison with dogs. Immunogenetics 54: 490-500.

Seddon JM, Ellegren H (2004) A temporal analysis shows major histocompatibility complex loci in the Scandinavian wolf population are consistent with neutral evolution. Proceedings of the Royal Society of London B 271: 2283-2291.

She JX, Boehme SA, Wang TW, Bonhomme F, Wakeland EK (1991) Amplification of major histocompatibility complex class-II gene diversity by intraexonic recombination. Proceedings of The Natlional Acadademy of Science USA 88: 453–457.

Sommer S (2005) The importance of immune gene variablity (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Frontiers in Zoology 2: 16.

Sommer R, Benecke N (2005) Late-Pleistocene and early Holocene history of the canid fauna of Europe (Canidae). Mammal Biology 70: 227–241.

Spassov N (1989) The position of Jackals in the *Canis* genus and life-history of the Golden Jackal (*Canis aureus L*.) in Bulgaria and on the Balkans. Historia Naturalis Bulgarica 1: 44–56.

Surridge AK, Loo W, Abrantes J, Carneiro M, Hewitt GM, Estevez PJ (2008) Diversity and evolutionary history of the MHC *DQA* gene in leporids. Immunogenetics 60: 515-525.

Takahata N, Nei M (1990) Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. Genetics 124: 967-978.

Takahashi K, Rooney AP, Nei M (2000) Origins and divergence times of mammalian class II MHC gene clusters. Journal of Heredity 91: 198–204.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.

Trouwborst A, Krofel M, Linnell JDC (2015) Legal implications of range expansions in a terrestrial carnivore: the case of the golden jackal (*Canis aureus*) in Europe. Biodiversity and Conservation 24: 2593–2610.

Trowsdale J, Knight J (2013) Major Histocompatibility Complex Genomics and Human Disease. Annual Review of Genomics and Human Genetics 14: 301-323.

Wagner JL, Burnett RC, Works JD, Strob R (1996a) Molecular analysis of DLA-DRBB1 polymorphism. Tissue Antigens 48: 554–61.

Wagner JL, Burnett RC, DeRose SA, Strob R (1996b) Molecular analysis and polymorphism of the DLA-DQA gene. Tissue Antigens 48: 199–204.

Wagner JL (2003) Molecular organization of the canine major histocompatibility complex. Journal of Heredity 94: 23-26.

Wilson DJ i McVean G (2006) Estimating diversifying selection and functional constraint in the presence of recombination. Genetics 172: 1411–1425.

Wilson PJ, Grewal S, Lawford ID (2000) DNA profiles of the eastern Canadian wolf and the red wolf provide evidence for a common evolutionary history independent of the gray wolf. Canadian Journal of Zoology 78: 2156–2166.

Yuhki N, Beck T, Stephens R, Neelam B, O'Brien SJ (2007) Comparative Genomic Structure of Human, Dog, and Cat MHC: *HLA*, *DLA*, and *FLA*. Journal of Heredity 98: 390-399.

Zachos FE, Ćirovic D, Kirschning J, Otto M, Hartl GB, Petersen B, Honnen AC (2009) Genetic variability, differentiation and founder effect in golden jackals (*Canis aureus*) from Serbia as revealed by mitochondrial DNA and nuclear microsatellite loci. Biochemical Genetics 47: 241–250.

Web stranica

http://www.lovac.info/lov-divljac-hrvatska/divljac-lov-zivotinja-divljaci/4640-cagalj-se-siri-po-europi.html)

8. ŽIVOTOPIS

Željka Celinšćak (r. Jurčić) rođena je 24.11.1985. godine u Karlovcu gdje je završila opću gimnaziju 2004. godine. Iste godine upisala je studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na kojem je u listopadu 2010. godine diplomirala te stekla zvanje profesorice biologije i kemije. Tijekom studija bila je stipendistica Karlovačke županije. Kao apsolvent radila je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu na radnom mjestu tehnički suradnik (2009.-2011.). Na istom fakultetu 2011. upisala je poslijediplomski doktorski studij biologije. Bila je honorarno zaposlena na Institutu za transplantaciju i biomedicinu Ministarstva zdravstva (2011.-2012.), nakon čega je radila na zamjeni u nekoliko osnovnih škola na području Karlovačke županije. Trenutno je zaposlena u Osnovnoj školi Draganić na radnom mjestu učiteljice prirode i biologije. Izabrana je 2015. godine u nastavno zvanje Predavač kao naslovno zvanje u području prirodnih znanosti na Zdravstvenom Veleučilištu u Zagrebu, na kojem sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Biologija, Opća ekologija i Molekularna biologija. Udana je i majka dvoje djece.

POPIS RADOVA:

1. Arbanasić, H., Florijančić, T., **Celinšćak, Ž.**, Bošković, I., Galov, A. Substantial functional diversity accompanies limited major histocompatibility complex class II variability in golden jackal (Canis aureus): A comparison between two wild Canis species in Croatia. // Mammalian biology. 83 (2017) ; 27-33 (članak, znanstveni).

2. Blažević, S., **Jurčić, Ž.**, Hranilović, D. Perinatal treatment of rats with MAO inhibitor tranylcypromine. // Translational Neuroscience. 1 (2010) , 1; 49-54 (članak, znanstveni).

SAŽECI U ZBORNICIMA SKUPOVA:

1. Arbanasić, H., Florijančić, T., Bošković, I., **Celinšćak, Ž.**, Galov, A. Polymorphism of major histocompatibility complex *DRB1*, *DQA1* and *DQB1* CLASS II genes in Golden Jackal // Book of Abstracts of First International Jackal Symposium / Duško, Ćirović (ur.). Beograd : Faculty of Biology, University of Belgrade, Serbia, 2014. 68-69 (predavanje,međunarodna recenzija,sažetak).

2. Bušić, M., Živčić-Ćosić, S., Pelčić, G., Župan, Ž., Anušić Juričić, M., **Jurčić, Ž.** The Croatian Model of Organ Donation and Transplantation // 9th ISCB Conference "Global and Deep Bioethics -From New Medical Ethics to the Integrative Bioethics" / Gordana Pelčić, Goran Pelčić (ur.). Rijeka : Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 2012. 19-21 (predavanje,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

KONGRESNO PRIOPĆENJE:

1. Blažević, S.A., Dolenec, P., **Jurčić, Ž.**, Hranilović, D. Pharmacologically induced hyperserotonemia: Perinatal treatments of rats with 5- hydroxytryptophan and tranylcypromine // Periodicum biologorum, 6th Croatian congress of pharmacology with international participation, Vol 112, Suppl 1 / Župan, Gordana (ur.). Zagreb, 2010. 95 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).